

**Titre:** Développement de méthodes pour la quantification des particules  
pseudo-virales d'influenza  
Title:

**Auteur:** Alexandre Lennaertz  
Author:

**Date:** 2012

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Lennaertz, A. (2012). Développement de méthodes pour la quantification des  
Citation: particules pseudo-virales d'influenza [Master's thesis, École Polytechnique de  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/788/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/788/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:** Olivier Henry, & Amine Kamen  
Advisors:

**Programme:** Génie chimique  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES POUR LA QUANTIFICATION DES  
PARTICULES PSEUDO-VIRALES D'INFLUENZA

ALEXANDRE LENNAERTZ

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE )

MARS 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES POUR LA QUANTIFICATION DES  
PARTICULES PSEUDO-VIRALES D'INFLUENZA

présenté par : LENNAERTZ Alexandre

en vue de l'obtention du diplôme de : MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., président

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. KAMEN Amine, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. MERZOUKI Abderrazzak, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Je tiens avant toute chose à présenter mes remerciements à mes deux directeurs de recherche, le Dr Amine Kamen, chef du groupe « Technologie des cellules animales » du secteur Bioprocédés de l'IRB-CNRC ainsi que le Prof. Olivier Henry, professeur à l'École Polytechnique de Montréal, pour l'opportunité qu'ils m'ont offerte de réaliser ce projet passionnant. Je tiens à remercier le Dr. Amine Kamen pour la chance qu'il m'a donnée de pouvoir travailler au sein de son équipe expérimentée et hautement qualifiée. Également, je soulignerai les conseils avisés et l'écoute attentive que m'a donnés le Prof. Olivier Henry.

Je souhaiterais également remercier tout particulièrement ceux qui m'ont entouré de près ou de loin dans ma vie de tous les jours au sein du laboratoire. Ainsi, j'envoie mes remerciements sincères à Julia Transfiguration, Hongtao Qi et Emma Petiot pour leur aide, leur expertise et leurs larges contributions dans l'élaboration de cette maîtrise. Merci également à Danielle Jacob et Johnny Montes qui m'ont épaulé pour la partie production. Je souhaite également remercier les autres membres du groupe avec lesquels j'ai régulièrement interagi : Rosa Tran, Alice Bernier, Yimi Mena.

Merci aussi à notre chère équipe d'étudiants et post-doctorants avec qui j'ai pu partager un grand nombre de moments en dedans et en dehors du laboratoire : Sven Ansorge, Georg Hinterkoerner, Igor Slivac, Benjamin Wolters, Céline Raymond, Laurence Delafosse, Élodie Louvier et Charles Fortier. Un petit clin d'œil d'encouragement également à Christine Thompson qui poursuit le projet.

Enfin, je terminerai par remercier tous mes proches qui m'ont encouragé malgré la distance et celle qui m'a soutenu durant toute cette aventure et avec qui bien d'autres sont prévues. Merci à toi, Steph.

## RÉSUMÉ

Le virus de la grippe est connu de par le monde pour les nombreux problèmes de santé publique qu'il cause annuellement (nombreux malades voire même morts dans les cas les plus invasifs). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est perpétuellement en alerte afin d'être prête à répondre à toute nouvelle épidémie virulente du virus. C'est la raison pour laquelle la vaccination contre le virus influenza est fortement conseillée afin de contrer au mieux l'étendue de l'infection dans la population, incluant principalement les personnes à risque.

Les vaccins les plus couramment retrouvés sur le marché sont produits à partir d'œufs embryonnés de poulet et sont composés de virus sous forme inactivée ou encore atténuée. Considérant qu'une dose vaccinale est en moyenne obtenue au départ d'un œuf, cela pose des contraintes sévères au niveau de l'approvisionnement en cas de pandémies durant lesquelles un nombre très élevé de doses est requis. De plus, les longs délais d'approvisionnement (6 mois environ entre l'isolement de la souche virale et l'obtention du vaccin) ainsi que la possibilité d'un retour à la virulence soulèvent certaines problématiques à laquelle la communauté scientifique tente toujours de répondre.

Une des alternatives proposées pour pallier aux lacunes des modes de production traditionnels réside dans l'utilisation de la culture cellulaire comme plateforme de production des virus. Ainsi, plusieurs candidats vaccins contre la grippe, produits dans les cellules CHO ou les cellules VERO, sont actuellement en cours d'essais cliniques. Récemment, une nouvelle génération de vaccins, à base de particules pseudo-virales (ou VLP), a été développée. Les principaux avantages de ces particules pseudo-virales résident dans le fait qu'elles sont dénuées de génome viral, tout en comportant les antigènes nécessaires à l'activation du système immunitaire, tels que l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA).

Cependant, avant de pouvoir transposer la production de vaccins d'influenza à base de VLP dans un contexte industriel, un certain nombre de points critiques restent à développer et optimiser. Notamment, l'absence de génome est l'un des facteurs qui limite toujours l'établissement d'une méthode de quantification efficace pour ces particules. Ceci freine considérablement le développement des étapes de production et de purification, dont le suivi repose sur des méthodes

analytiques indirectes ou imprécises développées pour la quantification des protéines totales (SDS-PAGE, Western-Blot, quantification de protéines) ou pour celle de protéines spécifiques comme HA (SRID, test HA).

Les objectifs de cette maîtrise recherche se sont donc articulés autour du procédé général des VLP, incluant plus spécifiquement l'étude de leur production en culture de cellules d'insectes et la mise au point d'une méthode de quantification permettant de soutenir le développement de cette nouvelle génération de candidats vaccins d'influenza.

La production des VLP a été analysée avec un système d'expression composé de baculovirus recombinants (rBV) exprimant les protéines HA, NA et de matrice M<sub>1</sub> dans les cellules d'insectes Sf9 et High Five. Suite à des étapes de purification, les particules générées en cellules Sf9 ont été analysées par SDS-PAGE, Western-Blot et microscopie électronique. Cette dernière analyse a permis de détecter une contamination importante (100 à 1000 fois supérieure à la quantité de VLP présentes) par les baculovirus utilisés lors de la production de ces VLP. Une étape de purification supplémentaire n'a cependant pas permis de séparer efficacement les VLP du reste des contaminants. Malgré plusieurs modifications dans les paramètres de production (e.g. choix de cellules hôtes, concentration cellulaire à infection, choix de MOI, rapports entre les BV) et dans les paramètres de purification (e.g. traitement des cultures), les niveaux d'expression et de pureté des VLP n'ont pas pu être augmentés de manière significative. Lors de ces essais, il s'est avéré que les constructions de baculovirus disponibles, principalement celle contenant HA, étaient instables dans le temps, entraînant des rendements de production très faibles et limitant par le fait même la poursuite des travaux d'optimisation de production des VLP.

Parallèlement aux tests de production, le développement d'une méthode HPLC en phase inversée a été entrepris afin de permettre notamment la quantification de HA directement à même les surnageants de culture. En s'appuyant sur des travaux préliminaires réalisés sur des doses vaccinales par d'autres groupes de recherche, il a été possible de mettre en place une procédure adéquate permettant de détecter et quantifier de façon rapide et précise la concentration en HA présente dans des échantillons d'une culture de cellules HEK 293 infectées par un virus influenza de la souche A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Par le biais d'essais conduits avec des souches virales distinctes, il a également été démontré que la technique peut être utilisée pour analyser différents

types de HA. Dans l'optique d'un criblage rapide et précis des différentes stratégies de production des VLP, cette technique se démarque comme étant une méthode de choix.

## ABSTRACT

Every year, influenza is responsible for numerous health problems world-wide mainly due to infections, which can cause death in the most serious cases. The World Health Organization (WHO) is continuously on alert to rapidly respond to the possible emergence of a pandemic viral strain. For this reason, vaccination against influenza is recommended to prevent the infection from spreading to the population, the most concerning cases being within high risk group populations.

Vaccines frequently found on the market are obtained by viral replication in embryonated chicken eggs and contain inactivated or attenuated viruses. However, this production method presents limitations in terms of egg availability in the case of a pandemic as it is estimated that one vaccine dose is produced from one embryonated egg. Moreover, the process is long (about 6 months from the first strain isolation step to the final vaccine formulation) and the risk of virulence reactivation is another drawback that the scientific community is still trying to alleviate.

The use of the cell culture technology as an expressing platform for virus production has been proposed to circumvent the limitations of the current production method. Vaccine candidates against flu that are produced in CHO or VERO cells are currently being evaluated in clinical trials. Recently, a new generation of vaccines, based on Virus Like Particles (VLP) have been developed. These particles present some advantages as their activity relies mainly on influenza's viral immunogenic activators, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and are exempt of genetic material of the native virus.

However, some critical points still require further development and optimization to get any influenza VLP-vaccine production into an industrial environment. The lack of genome is actually one of the parameters that restrain the establishment of an efficient quantification method for these particles. Consequently, the development of production and purification methods are considerably hindered as the analytical techniques are limited to indirect and imprecise methods developed for total proteins (SDS-PAGE, Western-Blot, total protein quantification) or some specific proteins such as HA (SRID, HA assay).

The objectives of this research master are related to the VLP manufacturing process with a specific focus on the study of the production in insect cell culture and the set-up of a



quantification method that is able to support the development of this new generation influenza sub-unit vaccine.

Initially, VLP production has been studied with an expression system including recombinant baculoviruses (rBV) expressing the HA, NA, and M<sub>1</sub> matrix proteins in Sf9 and High Five insect cells. The particles produced in Sf9 cells were analyzed, after purification, by SDS-PAGE, Western-Blot and electron microscopy. The latter analysis detected an important contamination (about 100 to 1000 times superior to the VLP contents) by the baculovirus used for VLP production. Although another step of purification has been added, it was impossible to efficiently separate the VLP from the surrounding contamination. Modifications of the production (e.g. host cell system, cell concentration at infection, choice of MOI, ratio between the baculoviruses) and the purification parameters (e.g. culture treatments previous to harvest) did not give any improvement in the expression and purity levels of VLP. Furthermore, during these trials, the baculovirus constructions available, especially the rBV-HA, showed some infectious instability over time, leading to low production yields. Consequently, the VLP production optimization workplan was significantly delayed.

In addition to the production experiments, the development of a reversed-phase HPLC method was investigated in order to quantify the HA concentrations directly from the culture supernatant. A fast and accurate procedure, based on preliminary developments made by other research groups on vaccine doses, was found to detect and quantify the HA concentrations in the HEK 293 cell cultures infected by the A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) influenza virus. Experiments based on distinct viral strains demonstrated the potential of this method to analyze HA protein associated with different viral strains. Consequently, this method appears as a very effective and rapid screening technique for different VLP production strategies.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 LE VIRUS INFLUENZA.....</b>	<b>3</b>
1.1 GÉNÉTIQUE .....	3
1.2 STRUCTURE .....	4
1.3 CYCLE INFECTIEUX.....	4
1.4 RÉPONSE IMMUNITAIRE FACE AU VIRUS INFLUENZA.....	6
<b>CHAPITRE 2 LES PSEUDO-PARTICULES VIRALES D'INFLUENZA .....</b>	<b>8</b>
2.1 PRODUCTION CLASSIQUE DU VACCIN CONTRE LE VIRUS D'INFLUENZA .....	8
2.2 ALTERNATIVES DE PRODUCTION DU VACCIN PAR CULTURE CELLULAIRE .....	8
2.3 PARTICULES PSEUDO-VIRALES – UNE APPROCHE PROMETTEUSE POUR LA VACCINATION ..	9
2.4 STRATÉGIE DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION DES VLP .....	11
2.4.1 <i>Systèmes d'expression utilisés pour la production des VLP</i> .....	11
2.4.2 <i>Purification des VLP</i> .....	12
2.5 CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DES VLP DU VIRUS INFLUENZA .....	15
2.5.1 <i>Immunodiffusion radiale simple (SRID)</i> .....	15
2.5.2 <i>Test d'héماغglutination (test HA)</i> .....	16
2.5.3 <i>Dosage des protéines virales par test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)</i> .....	17
2.5.4 <i>SDS-PAGE et Western-Blot (WB)</i> .....	19

2.5.5	<i>Quantification de HA par HPLC en phase inversée.....</i>	19
2.5.6	<i>Résonance plasmonique de surface (SPR) .....</i>	20
<b>CHAPITRE 3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>		<b>22</b>
<b>CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>		<b>25</b>
4.1	PRODUCTION DES STOCKS VIRAUX .....	25
4.1.1	<i>Maintenance et culture de cellules d'insectes .....</i>	25
4.1.2	<i>Production des stocks de baculovirus recombinants.....</i>	25
4.1.3	<i>Test de productivité des stocks de baculovirus.....</i>	26
4.2	PRODUCTION DES PARTICULES PSEUDO-VIRALES EN CELLULES D'INSECTES .....	26
4.3	ÉTAPES DE CONCENTRATION ET PURIFICATION.....	27
4.3.1	<i>Concentration par coussin de sucrose .....</i>	27
4.3.2	<i>Purification par gradient d'iodixanol .....</i>	27
4.4	MÉTHODES DE QUANTIFICATION SPÉCIFIQUES AUX BACULOVIRUS .....	28
4.4.1	<i>Quantification des particules totales par cytométrie de flux.....</i>	28
4.4.2	<i>Quantification des particules totales par marquage au Syber Green I (HPLC) .....</i>	28
4.4.3	<i>Test d'infectivité des baculovirus (Titerless).....</i>	29
4.5	MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION LIÉES AU VIRUS INFLUENZA .....	29
4.5.1	<i>Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-Blot (WB).....</i>	29
4.5.2	<i>Microscopie électronique à coloration négative (NSEM).....</i>	30
4.5.3	<i>Quantification des protéines totales.....</i>	31
4.5.4	<i>Test d'hémagglutination (test HA) .....</i>	31
4.5.5	<i>Quantification de l'hémagglutinine d'influenza par RP-HPLC.....</i>	31
4.5.5.1	<i>Souches virales d'influenza .....</i>	32
4.5.5.2	<i>Production et purification d'un stock viral en bioréacteur de 3,5-L.....</i>	32
4.5.5.3	<i>Préparation des échantillons pour la RP-HPLC .....</i>	32
4.5.5.4	<i>Conditions d'opération du système d'HPLC .....</i>	33
4.5.5.5	<i>Collecte des pics, SDS-PAGE et Western Blot .....</i>	33
<b>CHAPITRE 5 RÉSULTATS .....</b>		<b>34</b>
5.1	PRODUCTION DE VLP D'INFLUENZA PAR LE SYSTÈME BV-CELLULES D'INSECTES .....	34
5.2	IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PARTICULES PSEUDO-VIRALES D'INFLUENZA PRODUITES PAR DES CELLULES Sf9 .....	36

5.3	ÉTUDE DES FACTEURS SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LE RENDEMENT EN VLP	
	D'INFLUENZA EN CELLULES D'INSECTES.....	43
5.3.1	<i>Influence du temps de récolte sur la production des VLP.....</i>	44
5.3.2	<i>Impact de la Neuraminidase sur le relargage des VLP dans le surnageant de culture .....</i>	44
5.3.3	<i>Influence des étapes de traitement et de purification du surnageant sur la qualité et les quantités de VLP obtenues.....</i>	46
5.4	QUANTIFICATION DE L'HÉMAGGLUTININE D'INFLUENZA PAR HPLC EN PHASE INVERSÉE (RP-HPLC).....	47
5.4.1	<i>Développement et optimisation de la méthode .....</i>	48
5.4.1.1	Conditions de séparation, de préparation d'échantillon et identification du pic.....	48
5.4.1.2	Stabilité du pic de la sous-unité HA1 .....	51
5.4.1.3	Validation de la méthode de quantification .....	52
5.4.2	<i>Suivi de production virale dans le surnageant cellulaire par mesure de HA.....</i>	55
5.4.3	<i>Spécificité de la méthode de RP-HPLC pour diverses souches d'influenza.....</i>	57
	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>60</b>
	<b>CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>65</b>
	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>69</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1 : Revue générale des procédés utilisés pour l'obtention de VLP d'influenza dans les cellules d'insectes, de mammifères et de plantes.....	14
Table 2.2 : Méthodes applicables pour la quantification des VLP d'influenza .....	18
Table 5.1 : Analyse de la teneur en protéines totales et de l'activité hémagglutinante dans les échantillons obtenus durant les étapes de purification des VLP. ....	38
Table 5.2 : Conditions de culture testées pour l'évaluation de l'impact de la neuraminidase, en présence de différents rapports entre les trois baculovirus, sur la production des VLP .....	45
Table 5.3 : Détails des différents traitements réalisés sur les productions de VLP en cellules Sf9 et en cellules High Five. ....	46
Table 5.4 : Quantification par test HA des standards internes de la souche A/PR/8/34 H1N1 .....	48
Table 5.5: Stabilité du pic de HA1 de la souche A/PR/8/34 après préparation .....	52
Table 5.6 : Évaluation de la précision de la méthode via la mesure des aires sous le pic et temps de rétention.....	52
Table 5.7 : Moyennes, écart-types et écart-types relatifs pour les pentes, résidus et coefficient de détermination des courbes standards.....	54
Table 5.8 : Comparaison des paramètres essentiels de la méthode de quantification selon les groupes de recherches. ....	63
Table annexe 1 : Profil d'élution pour la séparation et quantification des BV par HPLC.....	80
Table annexe 2 : Exemple de résultats obtenus pour le test de Titerless. + : puits infectés; - : puits non-infectés. ....	82
Table annexe 3 : Tableau explicatif pour la détermination du titre infectieux des BV.....	83
Table annexe 4 : Titres infectieux des stocks de rBV obtenus par Titerless pour les différentes productions.....	89
Table annexe 5 : Viabilités cellulaires mesurées lors des productions rBV. ....	90

Table annexe 6 : Aires sous le pic obtenues pour la sous-unité HA1 collectée-concentrée et le standard externe.....	91
Table annexe 7 : Estimation du facteur entre $\mu\text{g}$ de HA/mL et unités de HA/mL.....	93

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique du virus d'influenza A [19].....	3
Figure 1.2 : Cycle infectieux du virus influenza [37]. ....	5
Figure 1.3 : Les réponses immunitaires humorale et cellulaire suite à une infection par le virus de la grippe [41]. ....	6
Figure 2.1 : Modèle d'une VLP d'influenza. ....	10
Figure 2.2 : Procédé général de production et de purification pour l'obtention de particules pseudo-virales d'influenza. ....	13
Figure 2.3 : Représentation schématique des deux sous-unités de l'Hémagglutinine d'influenza [19] .....	19
Figure 5.1 : Western-Blot des surnageants et culots cellulaires des productions en simple et triple infections pour HA (A) et M <sub>1</sub> (B). (A) : Anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz – Sc80550) ; (B) : Anticorps monoclonal de souris anti-M <sub>1</sub> (Abcam – ab22396).....	35
Figure 5.2 : Cinétiques de croissance pour des cultures non-infectée et infectée avec les trois baculovirus pour la production de VLP. ....	37
Figure 5.3 : SDS-PAGE (A) et Western-Blot (B) des différents échantillons obtenus au cours du procédé de purification des VLP. (SN : surnageant) WB : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz). ....	38
Figure 5.4 : Microscopie électronique à coloration négative (Institut Armand-Frappier – INRS) de la fraction d'iodixanol # 3. ....	40
Figure 5.5 : Profils d'élution à 280 nm des différents échantillons obtenus au cours des étapes de purification. ....	41
Figure 5.6 : Western-Blots pour les différentes fractions du pic éluant à 7,5 min de l'échantillon 50x cc. (A) : anticorps monoclonal de souris anti-gp64 (eBioscience) (B) : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz). ....	42

Figure 5.7 : Western-Blots pour les différentes conditions de culture testées en présence de NA (A) : anticorps monoclonal de souris anti-gp64 (eBioscience) (B) : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz).....	45
Figure 5.8: A – SDS-PAGE coloration à l’argent; B - WB avec un sérum anti-HA (NIBSC).....	50
Figure 5.9 : Profil d’élution obtenu à 214 nm pour le standard interne A/PR/8/34 10x cc. (injection de 10 µL).....	51
Figure 5.10 : Courbes standards établies sur 7 jours (intervalle de 15 jours) pour la quantification de HA de $3,71.10^3$ à $9,51.10^5$ unités HA/mL (ou 3,57 à 5,98 log unités HA/mL).....	54
Figure 5.11 : Suivi de production virale par quantification des activités HA (Log unités HA/mL) par RP-HPLC et test HA pour des cultures à MOI de 0,01 (A) et 1,0 (B).....	56
Figure 5.12 : Profils d’élution obtenus à 214 nm pour les surnageants des différentes souches d’influenza (injection de 5 µL). ....	58
Figure 5.13 : Profils d’élution obtenus à 214 nm pour les perméats et rétentats des souches A/WS/33 H1N1 et A/Aichi/2/68 d’influenza (injection de 25 µL).....	59
Figure annexe 1: Description des étapes de dilution des BV pour le test Titer Less. ....	82
Figure annexe 2 : Courbe standard établie pour la protéine HA recombinante (Protein Sciences) pour la quantification de HA de 20,2 à 808,0 µg HA/mL.....	92



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acides aminés
Ac	Anticorps
AP	Aire sous le pic
BSA	Sérum d'albumine bovine
BV	Baculovirus
Cc	Concentré
CMV	Cytomégalovirus
DTT	Dithiothréitol
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FDA	Food and Drugs Administration
HA	Hémagglutinine
Hpi	Heures post-infection
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IAA	Iodoacétamide
M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub>	Protéines Matrices 1 et 2
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MOI	Multiplicité d'infection
NA	Neuraminidase
NSEM	Microscopie électronique à coloration négative
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PR	Puerto Rico
PVI	Particules Virales Infectieuses

RP	Phase inversée
RPM	Rotations par minute
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SN	Surnageant
SPR	Résonance plasmonique de surface
SRID	Immunodiffusion radiale simple
TCID <sub>50</sub>	Dose infectieuse moyenne de tissus de culture
TCLD <sub>50</sub>	Dose létale moyenne de tissus de culture
TR	Temps de rétention
VLP	Particules pseudo-virales
WB	Western-Blot

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE 1 – CARTES GÉNÉTIQUES DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT LES PROTÉINES DU VIRUS INFLUENZA.....</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXE 2 – QUANTIFICATION DES PARTICULES TOTALES PAR MARQUAGE AU SYBER GREEN I (HPLC) .....</b>	<b>79</b>
<b>ANNEXE 3 – TEST D'INFECTIVITÉ DES BACULOVIRUS (TITER LESS).....</b>	<b>81</b>
<b>ANNEXE 4 – ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE SODIUM DODÉCYL SULFATE (SDS-PAGE) .....</b>	<b>84</b>
<b>ANNEXE 5 – WESTERN BLOT .....</b>	<b>87</b>
<b>ANNEXE 6 – ANALYSE DE L'INFECTIVITÉ DES STOCKS DE BACULOVIRUS PRODUITS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANNEXE 7 – ETABLISSEMENT D'UNE COURBE STANDARD EN RP-HPLC EXPRIMANT LA CONCENTRATION DE HA EN <math>\mu</math>G/ML.....</b>	<b>91</b>

## INTRODUCTION

### Contexte

Chaque année, des épidémies saisonnières du virus de la grippe provoquent un taux élevé d'infection et de mortalité à travers le monde. Celles-ci sont dues aux modifications génétiques continues du virus, ce qui représente une menace persistante pour la santé [1]. Annuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rapporte près de 500 millions de cas d'infection de grippe ainsi que 250 000 à 500 000 morts [2, 3]. La dernière pandémie de 2009, causée par le virus influenza A de souche H1N1, a mis en lumière les lacunes des modes de prévention disponibles pour répondre à cette problématique de santé publique [4, 5].

Actuellement, la vaccination demeure le moyen le plus efficace pour combattre une infection par le virus de la grippe. Les vaccins, ciblant les souches circulantes les plus importantes au niveau sérologique (deux de type A et une de type B), sont générés à l'aide d'œufs embryonnés de poulet. Bien que cette technique de production soit bien établie, elle présente néanmoins de nombreux désavantages. Tout d'abord, la procédure est très longue et requiert, au minimum, une période de 6 mois entre l'isolement de la souche d'intérêt et l'obtention du vaccin final. De plus, l'augmentation de la production est fortement dépendante de la quantité d'œufs disponibles, étant donné qu'une dose vaccinale est en moyenne obtenue au départ d'un œuf. Enfin, l'immunité humorale hautement spécifique due aux fréquentes variations antigéniques et le manque d'efficacité pour certains groupes à risques (particulièrement les enfants et personnes âgées) causent de sérieuses limitations. Dans le cas de nouvelles pandémies, cela pourrait mener à des situations particulièrement dramatiques, surtout en cas de pénurie d'approvisionnement en œufs embryonnés [6-8].

C'est pourquoi de nouvelles stratégies, utilisant les technologies récentes de l'ADN recombinant, ont été proposées afin d'améliorer les procédés de fabrication des vaccins et de supprimer les contraintes liées à la production dans les œufs. Celles-ci se basent sur les activateurs immunogéniques viraux que sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Ces deux glycoprotéines peuvent être exprimées dans les cellules mammifères, d'insectes et de plantes donnant ainsi des protéines recombinantes ou encore des particules pseudo-virales (ou VLP de

l'anglais « Virus Like Particles »). Ces VLP présentent un grand intérêt de par l'induction de la forte réponse immunologique qu'elles suscitent, couplé à l'absence d'infectivité ainsi qu'à des temps de production beaucoup plus courts. Ces caractéristiques font des VLP une avenue prometteuse dans le contexte du développement de nouveaux types de vaccin contre le virus de la grippe [2, 7, 9-13].

Bien que des essais à l'échelle de laboratoire aient démontré le fort potentiel de cette technique pour fournir rapidement des doses vaccinales, il n'en reste pas moins qu'elle nécessite certaines améliorations afin de pouvoir transposer la production à l'échelle industrielle. Par ailleurs, l'absence d'une méthode de quantification fiable et robuste pour les vaccins à base de VLP d'influenza est l'un des principaux facteurs qui freine le développement de ce procédé. Actuellement, les titres rapportés dans la littérature se basent essentiellement sur des estimations obtenues par Western-Blot et microscopie électronique [14, 15] et ce, sur des échantillons purifiés et concentrés. Afin de pallier à ce manque de précision dans la quantification des VLP, différentes approches sont en cours de développement. Parmi celles-ci, l'HPLC couplée ou non à un détecteur spécifique pour protéines totales ou à résonance plasmonique de surface pourrait faciliter grandement les efforts d'optimisation des procédés en cours [16, 17].

## **Organisation du mémoire**

Après un rappel introductif sur le virus influenza (Chapitre 1), ce mémoire présente une revue de littérature (Chapitre 2) sur les progrès récents réalisés pour le développement des procédés de fabrication de vaccins à base de VLP, y compris les étapes de production, purification et quantification. Les besoins actuels en termes de suivi de la concentration en VLP, à la fois durant la production et au cours des étapes de purification, y sont également abordés. Suivent alors les objectifs de recherche propres à cette maîtrise (Chapitre 3). Le Chapitre 4 reprend un descriptif des techniques employées. Les différents résultats obtenus sont présentés dans le Chapitre 5. Enfin, une discussion générale et une série de conclusions/recommandations clôturent ce mémoire.

## CHAPITRE 1 LE VIRUS INFLUENZA

### 1.1 Génétique

Le virus influenza appartient à la famille des Orthomyxoviridae. Son génome est composé d'ARN simple brin négatif segmenté. La capside virale est enveloppée par une membrane bilipidique provenant de son bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée [18].

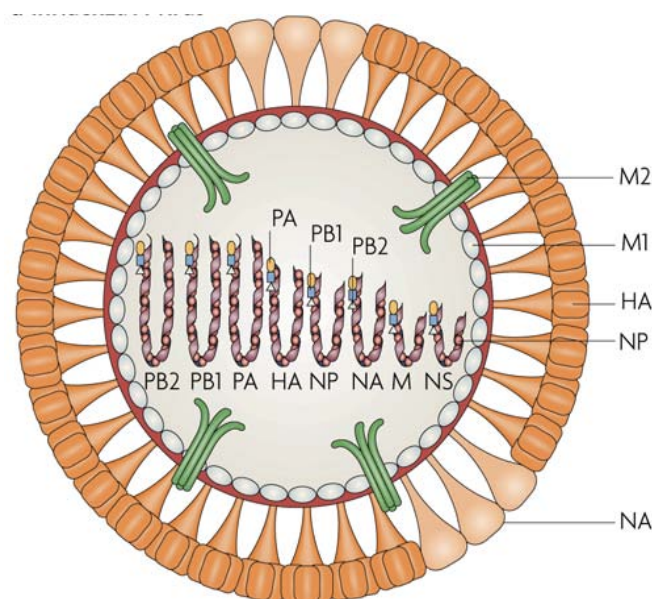


Figure 1.1 : Représentation schématique du virus d'influenza A [19]

On compte trois types sérologiques différents pour le virus, à savoir A, B et C. Les types A et B ont un génome composé de 8 segments alors que le génome du serotype C en comporte 7. Les types d'influenza sont également caractérisés par l'antigénicité des structures virales internes et conservées que sont la nucléoprotéine (NP) et les protéines matricielles d'enveloppe M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> (Figure 1.1) [4]. Les virus du type A et B représentent une menace continue pour la santé à cause de leurs modifications génétiques permanentes. Ces variations sont rendues possibles grâce à la segmentation du génome et la capacité du virus à infecter diverses espèces d'animaux, telles que les oiseaux aquatiques, l'Homme et le porc. Ce dernier est fortement sensible aux virus humains et aviaires, ce qui en fait un intermédiaire de choix pour la diffusion et la recombinaison du virus dans d'autres espèces, menant ainsi à la génération de nouveaux virus (« shifts » antigéniques) [20]. Cela peut donc entraîner des pandémies telles que celles survenues en 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), et 1968 (H3N2) suite à

l'adaptation de virus aviaires chez l'Homme [4, 21]. La segmentation du génome rend possible le réassortiment génétique entre deux virus de souches différentes dans la cellule hôte [20].

## 1.2 Structure

Le virus influenza est enveloppé par une bicouche lipidique qui est acquise lors de son bourgeonnement hors de la cellule infectée [18]. Les protéines principales de la membrane sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). HA permet le lien entre le virus et le récepteur sialique présent au niveau de la membrane des cellules infectées. NA joue un rôle clé dans le relargage du virus dans le milieu extérieur en clivant les récepteurs sialiques des cellules productrices, empêchant tout lien entre les provirus et ces récepteurs [22, 23]. Le type A possède différents sous-types antigéniques pour HA et NA. Actuellement, 16 variants pour HA et 9 pour NA ont été identifiés chez les oiseaux sauvages et d'élevages à travers le monde. Chacun d'eux a été caractérisé en fonction de ses propriétés antigéniques [24-26]. La protéine  $M_2$ , agissant en tant que canal à ions, se retrouve également au niveau de la membrane. Ces trois protéines sont présentes dans diverses formulations vaccinales à cause de leurs propriétés immunogéniques [27-32]. Enfin, la protéine de matrice  $M_1$ , située à l'intérieur de la membrane, pourrait intervenir dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus, bien que ce rôle soit toujours controversé [12, 18, 33-35].

## 1.3 Cycle infectieux

Le virus d'influenza est capable de se répandre de façon très efficace dans des populations grâce à une virulence extrême, une forte aptitude à se transmettre et une capacité élevée à infecter les jeunes enfants et les personnes âgées [30, 36]. Le virus se réplique rapidement dans les cellules épithéliales des tractus respiratoires supérieur et inférieur en causant des infections sévères pour les individus touchés [11, 37]. Le cycle infectieux du virus prend son départ suite à la liaison entre les hémagglutinines et les récepteurs sialiques présents à la surface de la membrane de la cellule hôte (Figure 1.2). La spécificité de l'hôte, fonction de

son origine mammifère ou aviaire, est déterminée par le type de récepteurs sialiques (Sia2-6Gal ou Sia2-3Gal) [23, 37]. L'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule se fait sous forme d'endosome (2). Une diminution du pH au sein de cet endosome, provoquée par la pompe à ions virale (protéine M<sub>2</sub>), provoque la fusion de l'enveloppe virale avec celle de l'endosome (3) [38]. Cette fusion est essentielle pour l'infectivité du virus car elle permet la libération des segments viraux dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les segments d'ARN négatifs libérés se déplacent ensuite vers le noyau (4) où la réplication du génome ainsi que la synthèse des ARNm se déroulent (5). Cette réplication nucléaire du génome est contraire au cycle classique des autres virus à ARN qui se répliquent, eux, dans le cytoplasme [39]. La formation des virions se réalise aux environs de la membrane plasmique avec la ségrégation de toutes les protéines structurales (HA, NA, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>) et régulatrices (NP, PB<sub>1</sub>, PB<sub>2</sub>, PA et NS<sub>1&2</sub>) (6). L'interaction entre toutes ces protéines est nécessaire pour le bourgeonnement optimal des particules virales néo-synthétisées ainsi que pour leur relargage dans le milieu extracellulaire (7) [40].

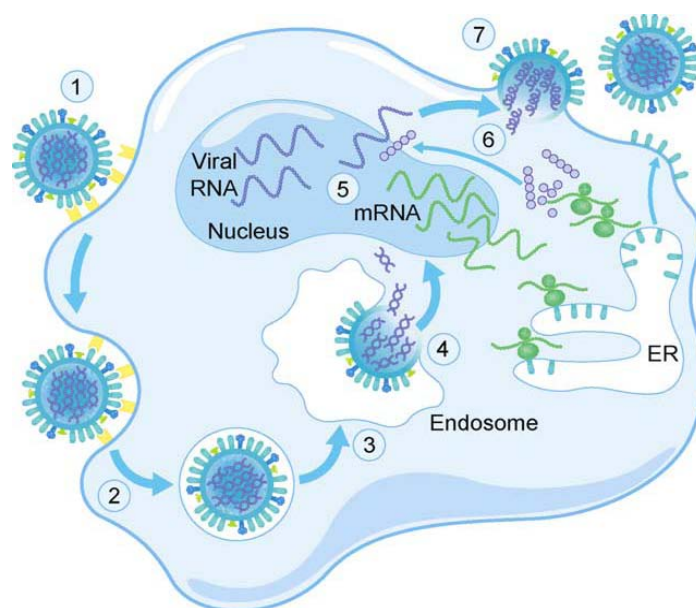


Figure 1.2 : Cycle infectieux du virus influenza [37].



## 1.4 Réponse immunitaire face au virus influenza

Le système immunitaire humain est complexe et comprend de nombreuses voies permettant de contrer une attaque d'agents infectieux. Le meilleur moyen pour lutter contre le virus de la grippe demeure la vaccination. Celle-ci a pour but d'activer l'immunité dite « acquise » ou « adaptative » (par opposition à l'immunité naturelle), permettant de maintenir une protection à long terme contre l'infection virale (effet mémoire assuré par les cellules immunitaires) (Figure 1.3). L'activation de l'immunité acquise s'enclenche quelques jours après la première infection. Lors d'une seconde infection par le même agent pathogène, la réponse immunitaire est activée plus rapidement. C'est la raison pour laquelle la vaccination est requise pour lutter contre influenza afin de préparer le système immunitaire à une attaque saisonnière du virus. L'immunité acquise est par ailleurs divisée en deux classes toutes deux intimement reliées, l'humorale et la cellulaire. L'immunité humorale est liée à la production d'anticorps par les lymphocytes B alors que l'immunité cellulaire est assurée par les lymphocytes T se différenciant en cellules T CD4 (helper) et cellules T CD8 (cytotoxiques) [41].

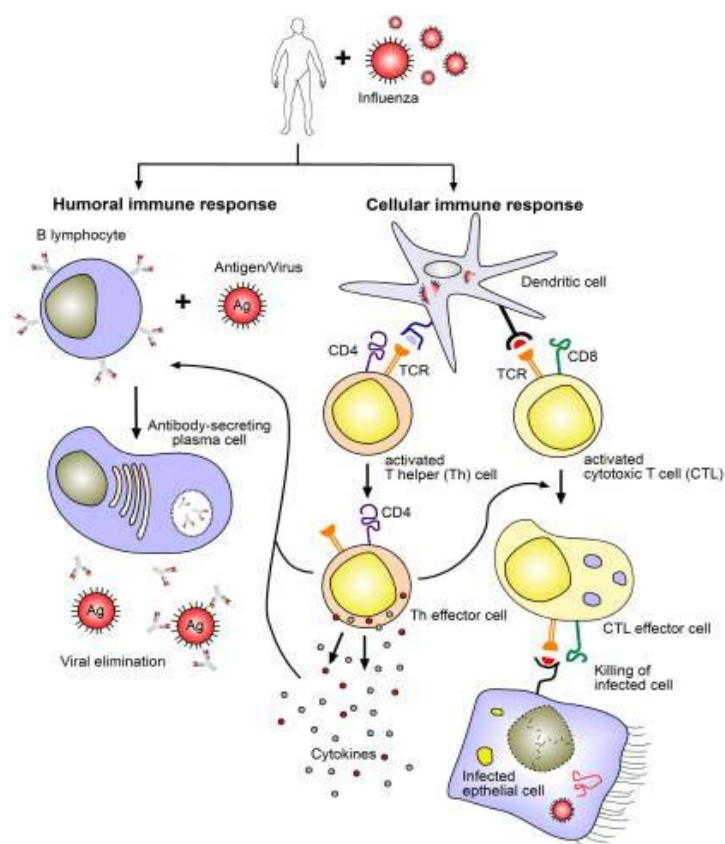


Figure 1.3 : Les réponses immunitaires humorale et cellulaire suite à une infection par le virus de la grippe [41].

La réplication du virus influenza se déroule rapidement dans les tractus respiratoires. Le système immunitaire humain réagit alors par différentes voies (naturelle ou acquise) pour contrecarrer cette infection [42]. L'immunité acquise agit par différentes voies. D'une part, les lymphocytes B, grâce à des immunorécepteurs, détectent l'infection suite à la reconnaissance des antigènes viraux HA et NA à l'état natif et mènent à la production d'anticorps spécifiques [31]. D'autre part, les cellules dendritiques captent et apprêtent les antigènes pour les présenter aux cellules T dans le contexte des CMHI et II [41]. Cette présentation active dès lors l'immunité cellulaire spécifique liée aux lymphocytes T cytotoxiques, cruciale pour la destruction des cellules infectées [37]. La plupart des vaccins disponibles sont formulés selon le sérotype des protéines d'enveloppe virale, HA et NA [14, 43]. Récemment, de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation d'autres antigènes viraux, tels que les protéines M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, ont été proposées [30, 32]. Quel que soit le système de vaccination utilisé, une activation des cellules B et T est requise afin d'aboutir à une protection efficace à long terme [28].

Les essais d'immunisation sur des animaux (souris, furets, etc.) demeurent primordiaux pour évaluer l'efficacité des candidats vaccins. Cette étape est également importante pour les vaccins-VLP afin de tester l'activation du système immunitaire *via* différentes voies d'administration (e.g. intranasale, intramusculaire ou sous-cutanée) [11, 44]. Les doses vaccinales sont normalement basées sur le titre HA et/ou la concentration en protéines totales du candidat vaccin [45]. Quatre à sept semaines post-infection, il est possible de détecter dans le sérum de l'individu vacciné un pic d'anticorps spécifiques contre le virus. Le vaccin sera dès lors considéré comme efficace selon les titres en sérum inhibiteur d'hémagglutination qu'il confère [46].

Ainsi, une immunisation par voie intranasale avec des VLP de la souche PR8 a été reconnue comme une approche efficace, fournissant une protection à 100% contre les souches PR8 ainsi que WSN. Ces résultats démontrent que les constructions de vaccins-VLP peuvent assurer une protection contre des souches homologues et hétérologues d'influenza. Dans certains cas, l'addition d'adjuvant au produit a été testée. [30]. Il apparaît maintenant que la structure des VLP doit être maintenue pour préserver leur pouvoir d'immunisation [47].

## **CHAPITRE 2 LES PSEUDO-PARTICULES VIRALES D'INFLUENZA**

### **2.1 Production classique du vaccin contre le virus d'influenza**

Actuellement, le vaccin contre le virus d'influenza est composé de trois souches virales inactivées (deux de type A et une de type B), chacune obtenues au départ d'œufs embryonnés de poulet selon une approche développée il y a plus de 60 ans. Annuellement, des mises à jour des souches virales sont effectuées selon les dernières variations antigéniques, principalement observées durant la période hivernale. Après une étape d'identification des souches circulantes, les virus sont adaptés par un réassortiment génétique avec une souche de base (A/PR/8/34 ou similaire) ayant un taux de multiplication élevé dans les œufs. Chaque virion réassorti peut ensuite se répliquer avec des titres élevés dans le fluide allantoïque des œufs embryonnés de poulet. Après récolte, les virions sont inactivés chimiquement ou par UV et purifiés [8].

Bien que cette procédure présente un certain nombre d'inconvénients, elle n'en reste pas moins la plus utilisée dans l'industrie, car bien établie et relativement peu onéreuse. Toutefois, les longs délais de production (environ 6 mois), les difficultés liées à la mise à l'échelle ainsi que la haute spécificité de l'immunité humorale due aux fréquentes variations antigéniques et la susceptibilité des œufs à une infection par un virus influenza aviaire sont des contraintes particulièrement critiques en cas de pandémie [6-8, 48]. De plus, le vaccin trivalent inactivé n'est pas toujours optimal pour les personnes à haut risque. Dans le cas des enfants et des personnes âgées, la formulation n'est pas capable d'induire une réponse immunogénique forte, ce qui n'assure pas une protection optimale pour ces patients [49]. De ce fait, plusieurs alternatives sont proposées afin d'améliorer la fabrication des vaccins contre influenza pour ainsi réduire, voire même supprimer, les contraintes rencontrées avec la production dans les œufs.

### **2.2 Alternatives de production du vaccin par culture cellulaire**

Des méthodes ont récemment testé l'aptitude de cultures de cellules de mammifères, d'insectes et de plantes à fournir le virus sous forme sauvage, recombinante ou sous-unitaire.

Ainsi, Ali *et al.* [40] ont développé un système pour la production d'influenza dans les lignées cellulaires HeLa, MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), et MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). Une autre approche, proposée par de Wit *et al.* [50], se base sur la construction du virus recombinant H1N1 complet au départ d'une culture de cellules 293T. *Via* l'utilisation de la méthode de génétique inverse, il est en effet possible d'obtenir tous les gènes nécessaires à l'expression du virus sauvage complet dans les cellules. Il a également été rapporté que l'emploi de certaines sous-unités virales ou particules virales pourrait suffire pour activer le système immunitaire et apporter une immunisation permanente contre une infection subséquente par le virus sauvage [27, 28, 31, 51]. Ainsi, les cellules animales (Vero et MDCK essentiellement) sont utilisées comme plateforme d'expression dans un grand nombre d'essais cliniques reliés au vaccin de la grippe [52, 53].

Plus récemment encore, le vaccin FluBlok®, basé sur un système baculovirus-cellules d'insectes exprimant trois hémagglutinines recombinantes, a été évalué comme substitut au vaccin obtenu par production virale dans les œufs [45]. Enfin, certains groupes axent leurs recherches sur la production de particules pseudo-virales (VLP). Ces VLP sont obtenues au départ de différentes lignées cellulaires couplées à l'utilisation de diverses constructions génétiques [12, 32, 54].

### **2.3 Particules pseudo-virales – une approche prometteuse pour la vaccination**

L'utilisation de particules pseudo-virales (VLP) pour la prévention d'infections virales est de plus en plus fréquente. Dès 2003, plus de trente vaccins à base de VLP et dirigés contre des virus humains et animaux, étaient disponibles. Ces VLP regroupent tous les types de virus et sont composées d'une capside simple ou complexe (virus non-enveloppés) et/ou d'enveloppes lipidiques (virus enveloppés comme l'influenza) [55].

Les particules pseudo-virales sont caractérisées par le fait qu'elles sont non-infectieuses, incapables de se répliquer et présentent les antigènes viraux biochimiquement actifs et intacts [49]. Elles sont également exemptes de matériel génétique, mais possèdent toutes les caractéristiques requises afin d'induire la réponse immunitaire [56]. De ce fait, elles activent l'immunité acquise dont les cellules dendritiques qui peuvent capturer les antigènes et les

exposer aux lymphocytes T [57-60]. Cependant, à ce jour, l'activation de la réponse immunitaire par les VLP demeure plus faible que celle observée pour les vaccins à base de virus inactivé ou de protéines recombinantes [61].

Les VLP d'influenza sont composées d'une membrane bilipidique provenant de la cellule infectée ou transfectée. Liées à cette membrane, on retrouve, en fonction de la stratégie de construction employée, des protéines virales telles que HA, NA, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> (Figure 2.1). Le diamètre moyen de ces particules est similaire à celui des virus sauvages et avoisine 80 à 120 nm [62]. Ces caractéristiques confèrent aux VLP les propriétés de pseudo-virus, car elles sont incapables d'infecter les cellules de par l'absence de génome [44, 63]. Ainsi, grâce à leurs effets immunogéniques néfastes réduits, leur temps de production court (environ 10 semaines pour l'obtention d'un vaccin [32]) et la capacité de créer des vaccins multivalents, les VLP offrent de nombreux avantages dans l'élaboration d'un nouveau type de vaccin [64].

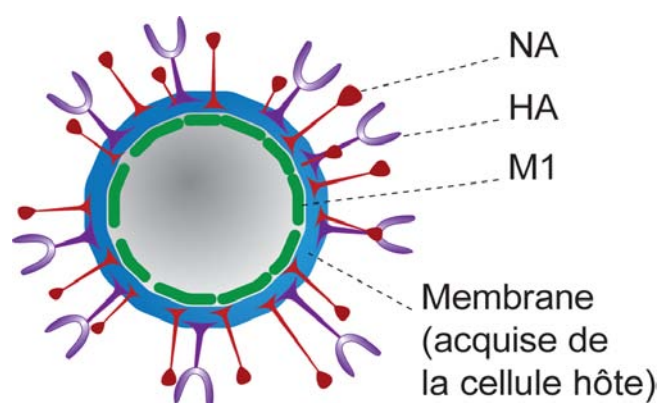


Figure 2.1 : Modèle d'une VLP d'influenza.

L'immunisation résultant de l'administration de VLP a déjà mené à un certain nombre de résultats prometteurs. Galarza *et al.* [28] ont ainsi démontré la possibilité de protéger des souris contre le virus A/Hong Kong/68 (H3N2) hautement pathogène pour celles-ci via une immunisation par voie intra-nasale sans ajout d'adjuvant. Des furets ont également pu être protégés contre le virus pandémique de 2009 par un vaccin sans adjuvant à base de VLP [65]. De même, Quan *et al.* [47] ont démontré la capacité de VLP, contenant la protéine HA de la souche H1N1 et injectées par voie intra-nasale, d'induire chez des souris une activité neutralisante assurée par l'immunité acquise pour une période de 5 mois contre le virus H1N1.

## 2.4 Stratégie de production et de purification des VLP

### 2.4.1 Systèmes d'expression utilisés pour la production des VLP

Différentes approches sont disponibles pour produire des VLP, dépendamment du type de virus ciblé, de la stratégie construction utilisée et de la nature du système d'expression. La génération de VLP dérivées de virus non-enveloppés est plus aisée car elle nécessite uniquement l'interaction entre quelques protéines de structure spécifiques. Cette observation est entre-autre valable pour le virus de Norwalk, responsable de plus de 95% des gastroentérites virales chez les adultes humains. Suite à l'expression de la protéine de capside recombinante du virus en cellules d'insectes, les VLP se forment suite à l'auto-assemblage de cette protéine, en absence de génome [66]. Dans le cas de virus enveloppés, la formation de VLP nécessite l'interaction de protéines virales avec la membrane cellulaire et le bourgeonnement de cette particule hors de la cellule [33, 54].

Les constructions de VLP contre influenza sont générées en culture de cellules de mammifères, d'insectes ou encore de plantes (Table 2.1) [9, 12, 67-69]. Le système d'expression le plus couramment employé à l'heure actuelle pour la production de VLP est fondé sur l'étude de l'infection de cellules d'insectes Sf9, dérivées d'ovaires de *Spodoptera frugiperda*, par des baculovirus (BV) recombinants [9, 34, 44, 61] (Table 2.1). Chaque BV contient une séquence d'ADN codant pour une ou plusieurs protéines virales, permettant ainsi l'élaboration de deux stratégies d'infection des cellules; infection simple (toutes les séquences génétiques d'intérêt sont contenues dans un seul BV) ou infection multiple (chaque BV contient un seul gène viral). Dans les deux cas, la multiplicité d'infection appliquée (MOI – rapport entre le nombre de cellules et de BV mis en présence) joue également un rôle important sur la proportion de BV capable de pénétrer dans chaque cellule ou encore sur les rendements de production. Suite à ces études, un certain nombre d'hypothèses ont été émises afin de définir clairement le mécanisme de bourgeonnement des particules hors des cellules d'insectes. Ali *et al.* [40] ont préalablement démontré que le relargage des VLP hors des cellules dépend de l'interaction entre la protéine M<sub>1</sub> et les glycoprotéines membranaires HA et NA. Latham *et al.* [34] ont ensuite observé que l'expression simultanée de HA et NA en présence des protéines M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> donne lieu au bourgeonnement des particules. Toutefois, d'autres groupes produisent également des VLP avec seulement deux de ces quatre protéines [32, 64] (Table 2.1). Ces résultats sont donc quelque peu contradictoires et soulignent le

manque d'information concernant le rôle précis des différentes protéines impliquées dans le processus de bourgeonnement des particules [70].

La production de VLP peut également se faire *via* d'autres systèmes d'expression, comme les cellules de mammifères ou de plantes. Dans le cas des cellules de mammifères, Wu *et al.* [56] ont démontré l'efficacité de VLP, produites en cellules Vero suite à une co-expression stable des protéines structurales HA, NA, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, à immuniser des souris suite à une vaccination avec 2,5 µg de VLP. Bien que leur production apparaisse comme moins efficace qu'avec des cellules d'insectes en termes de rendements, les VLP produites en cellules de mammifères induisent une réponse immunitaire adaptée contre une infection par le virus de l'influenza. De plus, il semble que le vaccin-VLP obtenu dans les cellules de mammifères soit mieux toléré par le système immunitaire humain que celui dérivé des cellules d'insectes [71]. Enfin, D'aoust *et al.* [12] et Landry *et al.* [72] ont successivement généré des VLP dans les cellules de plantes suite à une agro-infiltration des gènes spécifiques codant pour les protéines virales. Suivant les protocoles préétablis pour les candidats vaccins dérivés des autres systèmes d'expression, le vaccin provenant des cellules de plante a été testé dans les souris sur base de la quantité de HA injectée (µg/dose) (études résumées dans la Table 2.1).

## 2.4.2 Purification des VLP

Suite à la production des VLP et à leur relargage dans le surnageant de culture, des étapes de purification subséquentes sont nécessaires afin d'aboutir à l'obtention d'un produit pur et concentré menant ainsi au vaccin. Les étapes de purification utilisées à ce jour pour les VLP sont directement basées sur l'expérience acquise pour les vaccins à base de virus sauvage, étant donné que les propriétés physiques des VLP sont similaires à celles du virus d'origine. La Table 2.1 recense les principales approches utilisées pour la concentration et la purification des VLP.

La majeure partie des stratégies produisant des VLP en cellules d'insectes utilise le même schéma de purification (Figure 2.2). Tout comme pour l'obtention du vaccin inactivé, une centrifugation à faible vitesse permet dans une première étape d'enlever les cellules ainsi que leurs débris. Les particules (pseudo)-virales sont concentrées par ultracentrifugation par coussin ou gradient de sucrose. Les culots sont ensuite re-suspendus dans un tampon

approprié (généralement un tampon phosphate salin - PBS) avant une éventuelle dernière étape de purification par gradient de centrifugation [28, 33] (Table 2.1).

Ce procédé global de purification (DSP: de l'anglais, down-stream processing) n'est toutefois pas facilement applicable en continu. C'est pourquoi on retrouve dans le DSP de la compagnie Novavax Inc., capable de fournir jusqu'à 75 millions de doses par saison, une succession d'étapes de filtration et de chromatographies [73, 74]. Ces méthodes sont similaires à celles décrites pour les vaccins Cervarix et Gardasil, premiers vaccins contre le virus du papillome humain (VPH) à base de VLP approuvés par la FDA [75-77].

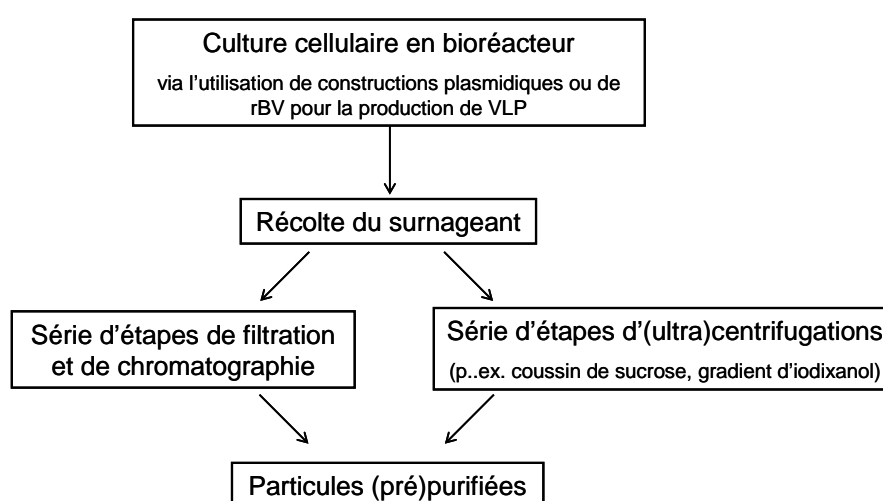


Figure 2.2 : Procédé général de production et de purification pour l'obtention de particules pseudo-virales d'influenza.

Bien que le schéma général de purification des VLP d'influenza semble bien établi, il n'en reste pas moins qu'une optimisation des conditions d'opérations des différentes étapes unitaires demeure nécessaire. Ces améliorations pourraient mener à la modification ou l'exclusion de certaines de ces techniques et à l'établissement de nouvelles technologies de remplacement.



Table 2.1 : Revue générale des procédés utilisés pour l'obtention de VLP d'influenza dans les cellules d'insectes, de mammifères et de plantes.

Souche virale	Système (lignée cellulaire pour la production, milieu)	Densité à infection ( $\times 10^6$ c/ml)	Système d'expression	MOI	Temps de récolte	Quantification	Purification	Références
A/Udorn/72 (H3N2)	Sf9, SFM	-	Quadruple rBV exprimant HA, NA, M1 & M2	5	72hpi	qME (rapport de HA:NA = 5:1)	Série de centrifugation Gradient d'iodixanol Gradient de sucrose	Latham, T. - 2001
A/PR8/34 (H1N1)	Sf9, SF900 II	-	rBV exprimant HA & M1	2 ; 4	72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME Immunisation de souris & test de neutralisation	Série de centrifugation Coussin de sucrose	Quan, F.S. - 2007
A/Fujian/411/2002 (H3N2)	Sf9, HyQ-SFX	2	rBV exprimant HA, NA & M1	3	72hpi	Analysé par SDS-PAGE & WB Test d'immunofluorescence (IFA) utilisant des cellules fixées et infectées	Coussin de sucrose	Bright, R.A. - 2007
A/HongKong/1073/99 (H9N2)	Sf9, HyQ-SFX	2	rBV exprimant HA, NA & M1	3	72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME Test d'immunofluorescence (IFA) utilisant des cellules fixées et infectées	Coussin de sucrose	Pushko, P. - 2005
A/PR/8/34 (H1N1) & A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)	Sf9, IPL-41-YE-3 Hi5, IPL-41-SF	1	rBV exprimant HA, M1 & GFP	10	72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME VLP testés par test HA & test d'infectivité pour les baculovirus	Série de centrifugation Coussin de sucrose	Krammer, F. - 2010
A/PR8/34 (H1N1)	Sf9, SF900 II MDCK, DMEM-10	-	rBV exprimant une flagelline membranaire, HA & NA	6 ; 2 ; 6	72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME Essais d'immunisation sur souris	Série de centrifugation Coussin de sucrose	Wang, B.Z. - 2008
A/Victoria/3/75 (H3N2)	COS-1, DMEM-10	1	Plasmides exprimant toutes les protéines d'influenza	5	72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME	Série de microcentrifugation Coussin de sucrose	Gomez-Puertas - 2000
A/Taiwan/083/2006 (H3N2) & A/Hanoi/30408/2005 (H5N1)	Vero, HyQ-10	-	Plasmides exprimant HA, NA, M1 & M2		72hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME Dispersion dynamique de la lumière (DLS) Immunisation de souris, test HA & ELISA	Série de centrifugation Coussin de sucrose Dialyse	Wu, C.Y. 2010
A/Chicken/FPV/Rostock/1934 (H7N1) & A/Thailand/KAN-1/04 (H5N1)	293T, -	-	Plasmides exprimant HA, NA & M2 assemblées en particules dérivées du MLV	-	-	Titres de transduction mesuré par FACS	Coussin de sucrose SDS-PAGE & WB	Szécsi, J. - 2006
A/Udorn/72 (H3N2)	293T & HeLa T4, DMEM-10	1	Vecteurs d'ADNr exprimant HA, NA, M1, M2 & NS2	-	48hpi	Analysé par SDS-PAGE, WB & qME Quantification de la GFP produite par FACS après transfection des cellules 293T	Série de centrifugation Coussin de sucrose	Chen, B.J. - 2007
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	293T, DMEM-10	0.5	BacMam BV exprimant HA, NA, et M1 avec des promoteurs CMV	60	72hpi	Analysé by WB & test HA Immunisation de souris et titres d'inhibition d'hémagglutination	Série de centrifugation Coussin de sucrose	Tang, X.C. - 2011
A/Indonesia/5/05 (H5N1) & A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	Plantes de Nicotiana benthamiana	-	Infiltration d'agrobacteries portant les gènes de HA & M1	-	144hpi	Test HA et qME Immunisation de souris et titres d'inhibition d'hémagglutination	Chromatographie d'exclusion de taille & d'affinité Série de filtration	D'Aoust, M.A. - 2008

## **2.5 Caractérisation et quantification des VLP du virus influenza**

L'évaluation de la qualité et de la quantité des VLP au travers des différentes étapes de production et de purification est critique pour la détermination de leur efficacité et l'amélioration de ces techniques. Ceci est d'autant plus important connaissant le manque de spécificité des méthodes utilisées. En effet, à l'heure actuelle, aucune méthode de quantification ne permet de déterminer la concentration en particules totales pour les VLP. Considérant que les VLP sont exemptes de génome et incapables de se répliquer dans les cellules hôtes, bon nombre de méthodes appliquées pour le virus sauvage (e.g. PCR, TCID<sub>50</sub> ou TCID<sub>50</sub>) ne sont pas applicables.

De ce fait, les méthodes pouvant être utilisées pour la quantification des VLP sont basées sur les protéines qui les composent. Ces méthodes mènent généralement à une approximation de la concentration en particules. Toutefois, dans le cas de matériel extrêmement pur, la quantification des protéines totales peut fournir une alternative. De même, diverses études démontrent l'intérêt de la microscopie électronique (NSEM) pour la détection et la caractérisation des VLP [56, 65]. La méthode se base sur la coloration négative des échantillons avant une analyse par microscopie électronique à transmission et à différents grossissements (Table 2.2). La NSEM fournit des informations qualitatives sur l'échantillon, telles que la taille et la morphologie de la particule. Cependant, le nombre total de particules ne peut être estimé que de façon approximative par cette approche.

D'un autre côté, certaines techniques établies comme l'immunodiffusion radiale simple (SRID) ou le test d'hémagglutination permettent la détermination de l'activité des VLP d'influenza (Table 2.1).

### **2.5.1 Immunodiffusion radiale simple (SRID)**

L'immunodiffusion radiale simple (SRID) demeure la seule méthode approuvée par les autorités régulatrices pour la quantification de HA présente dans les vaccins trivalents d'influenza [74]. Le test se base sur la reconnaissance spécifique entre les antigènes viraux et les anticorps dirigés contre HA dans un gel d'agarose. Les anticorps dispersés dans le gel

captent les antigènes libres capables de se déplacer radialement dans celui-ci. Le complexe antigène-anticorps crée alors un précipité en forme de cercle de taille proportionnelle à la concentration d'antigènes présents dans la préparation [78]. La concentration en HA est ainsi déterminée en fonction d'un standard de concentration connue (en  $\mu\text{g/mL}$ ) et également soumis au test. Pour la majeure partie des VLP possédant des protéines HA, cette technique est également applicable. Bien que hautement spécifique, cette méthode présente un certain nombre de limitations : travail laborieux, faible sensibilité et reproductibilité ainsi qu'un besoin d'une mise à jour annuelle des antigènes homologues et anticorps monoclonaux pour HA [17, 79]. Cette mise à niveau peut causer des retards préjudiciables dans les analyses des candidats vaccins en cas de pandémie, car il faut entre 2 et 3 mois entre l'obtention de l'antigène de référence pour HA et la production d'antisérums correspondants. C'est pourquoi l'OMS encourage les groupes de recherche et les industries pharmaceutiques à développer des alternatives qui permettront la quantification rapide et reproductible des vaccins néoformés afin de remplacer, à terme, le SRID [80].

### **2.5.2 Test d'hémagglutination (test HA)**

Une méthode simplifiée pour la détermination de l'activité de HA se base sur la capacité des HA, présentes au niveau des membranes virales, à maintenir les globules rouges (GR) (généralement provenant de poulets) en suspension, ou communément appelée agglutination [81, 82]. Ce test est moins laborieux que le SRID et donne de rapides indications sur les titres en HA. Ici, le test ne dépend pas du sérum mais bien des globules rouges. Ces derniers doivent être quotidiennement standardisés et s'agglutinent différemment selon la souche virale analysée [83]. A partir de la valeur d'activité de HA, il est possible d'obtenir une approximation du nombre de particules virales totales dans l'échantillon. Considérant que le nombre d'érythrocytes est proportionnel à celui des particules totales avec lesquelles elles s'agglutinent, la concentration virale dérive directement du produit entre la concentration en GR (généralement  $2 \cdot 10^7$  cellules/mL mélangées avec la dilution virale) et le titre en HA (en unités HA/mL) [84]. Malgré le fait qu'elle ne soit pas considérée comme une méthode standard par les autorités sanitaires, un grand nombre de groupes l'utilisent pour évaluer les taux et rendements de production et purification [85].

### **2.5.3 Dosage des protéines virales par test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)**

Le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ou ELISA a été développé de façon intensive pour l'évaluation de l'efficacité des candidats-vaccins grâce à la quantification des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines du virus de l'influenza, et tout particulièrement HA [86-89]. D'autres approches par ELISA ont été développées afin d'identifier et potentiellement quantifier la neuraminidase présente dans les préparations virales [90]. Récemment, une méthode ELISA a été établie pour la quantification d'hémagglutinines provenant de souches de types A et B [91]. Cette méthode se fonde sur la reconnaissance par deux anticorps spécifiques de glycans d'origine aviaire présents sur la surface des glycoprotéines HA. Malgré un certain nombre d'avantages potentiels, notamment une faible limite de détection (1,9 µg/mL vs 5 µg/mL pour le SRID), cette technique n'est pas applicable pour les vaccins-VLP car ces derniers ne peuvent être produits dans les œufs.

Le développement le plus prometteur pour la quantification de HA par ELISA est relié à l'identification d'une séquence peptidique hautement conservée pour un grand nombre de sous-types d'hémagglutinines d'influenza de type A [92]. Ceci a donné lieu à la production dans des lapins d'anticorps dirigés contre cette séquence universelle conservée. Ces anticorps sont capables de reconnaître 13 souches différentes des virus A et B. Des tests préliminaires sur un ELISA compétitif utilisant cet anticorps universel ont démontré des résultats encourageants pour la quantification de HA recombinantes ou provenant de vaccins humains et ayant conduit à l'obtention de valeurs similaires à celles obtenues par SRID. Cette méthode, suite à un approfondissement et une validation, pourrait être considérée comme une technique de quantification universelle pour toutes les protéines HA des souches d'influenza.

Table 2.2 : Méthodes applicables pour la quantification des VLP d'influenza

Méthode	Type de quantification	Limite de détection	Zone de quantification	Volume d'échantillon	Écart-type	Temps requis	Avantages	Désavantages	Références
<b>Immunodiffusion radiale simple (SRID)</b>	Activité de HA (µg HA/mL) par précipitation du couple antigène-anticorps dans un gel d'agarose	~5 µg/mL	~10-30 µg/mL	20 µL	9% (12 répliques)	~30h	Applicable pour les vaccins de virus entiers et clivés Spécificité de souche	Laborieux - radioactivité Reproductibilité faible Sensibilité limitée	Wood, J.M. - 1977
<b>Test d'agglutination (Test HA)</b>	Activité de HA (HA Unités/mL) selon l'agglutination de globules rouges avec les virus	0,15 log unités HA/mL	1 à 3 log unités HA/100µL	100 µL/dilution	~0,066 %	~5h	Réponse rapide Applicable pour différents types de préparation	Procédure généralement longue Valeurs discontinues Forte variation selon les GR et l'opérateur	Le Ru, A. - 2010 Kalbfuss, B. - 2008 Hierholzer, J. - 1996
<b>SDS-PAGE / WB</b>	Composition protéique du virus (SDS) et détection spécifique (WB)	selon les quantités injectées et la sensibilité des anticorps utilisés	-	max. 25µL	-	2 jours	Détermination générale de la pureté du produit Estimation de la quantité de la protéine ciblée	Valeurs devant se référer à un standard - Pas de standard disponible pour les VLPs	Harvey, R. - 2008
<b>Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)</b>	Concentration de HA (µg HA/mL) via reconnaissance d'antigènes par un anticorps universel	A définir	0,125 à 16 µg/mL (A confirmer)	~100 µl	-	2 jours	Applicable pour toutes les HA des souches A et B Utilisation d'un anticorps universel	Paramètres à définir précisément Anticorps universel et références requises	Chun, S. - 2008
<b>RP-HPLC</b>	Concentration de HA par séparation de la sous-unité HA <sub>1</sub> du reste de la matrice virale (µg ou HAU/mL)	0.4 µg/mL	8 to 62 µg/mL	100 µL	~2%	<3h	Limite de détection faible Applicable pour toutes les souches de HA Nombre élevé d'analyses possible	Besoin de référence pour standardiser les résultats	Kapteyn, J. - 2006-09 Garcia-Cañas, V. - 2006 Lorbetskie, B. - 2011
<b>Résonance plasmonique de surface (SPR)</b>	Quantité de protéine virale membranaire selon le type de ligand utilisé	<0.5 µg/mL	~1 to 15 µg/mL	40-80 µL	2% (5 répliques)	15h pour 96 échantillons/standards	Test multivalent Pas susceptible aux conditions de régénération Stable aux additifs présents dans l'échantillon	Analyses des résultats Relation entre le signal mesuré et la quantité de la protéine ciblée	Nilsson, C.E. - 2009

## 2.5.4 SDS-PAGE et Western-Blot (WB)

Une autre méthode couramment utilisée pour les VLP est la technique couplée SDS-PAGE/Western-Blot (WB), permettant l'analyse de la pureté des échantillons (SDS) et la reconnaissance de la protéine d'intérêt par un anticorps spécifique (WB). Une analyse quantitative en WB, par mesure de densitométrie, est utilisée dans diverses études et fournit une relation entre les protéines produites et des standards [93, 94]. Cette technique manque toutefois de précision et de standards universels pour les différentes souches d'influenza réduisant fortement son potentiel d'utilisation en tant que méthode de quantification (Table 2.2).

## 2.5.5 Quantification de HA par HPLC en phase inversée

Une quantification de l'hémagglutinine présente dans des doses vaccinales par HPLC en phase inversée a été décrite de façon approfondie par différents groupes. Dans cette méthode, HA0 (forme non réduite de HA) est divisée en ses deux sous-unités, HA1 et HA2, liées par un pont disulfure (Figure 2.3). HA1 est la sous-unité la moins hydrophobe de HA0, propriété sur laquelle se base la technique de quantification par RP-HPLC pour séparer cette sous-unité du reste de la matrice virale.

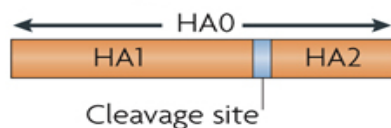


Figure 2.3 : Représentation schématique des deux sous-unités de l'Hémagglutinine d'influenza [19]

Kapteyn *et al.* [16, 95] ont proposé une méthode de quantification de HA1 par RP-HPLC où il a été notamment montré que la préparation de l'échantillon est critique pour l'identification et la stabilité du pic d'HA1. Les échantillons, dérivés de vaccins produits dans les œufs ou dans les cellules MDCK, sont préalablement traités avec du Zwittergent 1 % pour briser les membranes virales. De la trypsine est ensuite ajoutée afin de cliver HA0 en ses deux sous-unités HA1 et HA2. Les échantillons sont enfin réduits par addition de Dithiothréitol (DTT) et alkylés avec de

l'Iodoacétamide (IAA). L'échantillon contient alors la sous-unité HA1 libre qui est mesurée en sortie de colonne à phase inverse par des détecteurs UV (215nm) et à fluorescence (290/335nm). Une approche similaire, décrite par Garcia-Canas et Lorbetskie [96, 97], s'effectue sans l'ajout de trypsine. En effet, le rôle joué par la trypsine est pour le moins mal défini. Bien que Kapteyn *et al.* aient rapporté une faible perte de produit lorsque la trypsine n'était pas utilisée, son ajout n'a pas présenté d'avantage significatif pour la quantification (diminution d'environ 7 % du pic de HA1). La réduction de signal est probablement due à l'agrégation de HA1 avec les autres protéines du vaccin; agrégation qui serait vraisemblablement réduite par ajout de trypsine.

Selon ces deux groupes de recherche, la méthode présente une sensibilité élevée et permet de détecter des concentrations minimales de l'ordre de 1 µg/mL de HA. Le principal avantage de cette méthode est la rapidité d'analyse. De plus, elle ne requiert pas de sérum contre les antigènes HA. Toutefois, pour ne pas sous-estimer la concentration de HA, il est indispensable que le clivage de toutes les particules virales soit complet (Table 2.2).

La quantification de HA par RP-HPLC a été développée pour des vaccins monovalents de virus complet [16, 95, 96] ou encore des vaccins commerciaux trivalents [96]. Dans ces expériences, il a été observé que la préparation et la composition de la matrice (tampon, agents de conservation, sels) du produit affectent le résultat final. Par exemple, l'inactivation virale par la  $\beta$ -propiolactone crée des interférences qui provoquent des variations dans le temps de rétention (TR) et la largeur de pic. La souche dont provient HA influence également le TR de par sa composition en acides aminés (AA). Cette composition en AA, principalement la présence d'AA aromatiques (e.g. tryptophane et tyrosine) et le rapport entre les O- et N-glycosylations, jouent un rôle important au niveau du signal obtenu par les différents détecteurs [16].

## **2.5.6 Résonance plasmonique de surface (SPR)**

Récemment, une méthode permettant la quantification des virus totaux et basée sur la résonance plasmonique de surface (SPR), a été proposée par Nilsson *et al.* [17]. Ce biosenseur utilise la détection spécifique, par des ligands à faible affinité (soit des lectines ou des structures

carbohydratées spécifiques comme les acides sialiques), de protéines HA présentes sur la membrane virale [98, 99]. Ces deux types de ligands ne sont toutefois pas capables d'analyser simultanément des HA provenant de trois souches virales.

La technique met en contact trois composés: la protéine recombinante HA (rHA) immobilisée (le ligand), les virus en suspension et le sérum contenant les anticorps dirigés spécifiquement contre les virus à analyser. Dans un premier temps, les virus libres sont reconnus par les anticorps présents en excès dans le sérum. L'excédent d'anticorps se lie aux ligands rHA immobilisés sur la surface plasmonique. Cette liaison rHA-anticorps crée un signal proportionnel aux anticorps liés. Ainsi, le signal mesuré est inversement proportionnel à la concentration de virus dans l'échantillon [17, 98]. En comparaison avec le SRID, cette technologie est hautement sensible, précise et rapide. Les études préliminaires démontrent la possibilité de fixer d'autres composés, tels que des sous-unités virales ou encore des particules virales fragmentées [17]. Il pourrait donc être envisagé d'adapter spécifiquement cette méthode pour les VLP avec l'obtention de standards hautement définis et caractérisés (virus et HA recombinante).



### CHAPITRE 3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les particules pseudo-virales d'influenza présentent de nombreux avantages par rapport aux vaccins actuellement obtenu au départ des œufs et constituent une avenue prometteuse pour la lutte contre la grippe, notamment en cas de pandémie. Cependant, de nombreuses améliorations sont encore nécessaires au niveau du procédé et des méthodes de quantification avant de pouvoir envisager la production à grande échelle de vaccins-VLP.

Tout d'abord, au niveau de la production, la méthode généralement rencontrée est celle qui utilise les baculovirus comme vecteurs d'expression dans les cellules d'insectes. Or, ce système n'a pas encore fait l'objet d'une optimisation et pourrait poser quelques problèmes au niveau de la quantification et de la purification, notamment en raison d'un bourgeonnement simultané des deux virus (BV et influenza). En effet, la protéine majeure des BV, la protéine gp64, ainsi que les protéines d'influenza HA et NA, se situent toutes trois sur la membrane cellulaire. Tandis que HA et NA sont localisées au niveau des radeaux lipidiques des cellules infectées [100], gp64 semble se situer dans le microdomaine de la membrane [101]. Cependant, la distribution membranaire n'est généralement pas parfaite et il est donc possible que chacun des virus enveloppés emporte des molécules étrangères durant leur bourgeonnement. De ce fait, les VLP d'influenza et les BV peuvent incorporer dans leurs enveloppes membranaires un mélange de gp64, HA et NA. Dépendamment du niveau de production des deux virus, il se pourrait que le procédé de purification requière l'ajout d'étapes supplémentaires pour assurer l'élimination des contaminants [102], un aspect critique pour le processus de validation par les autorités de santé [103]. Évaluer les quantités respectives de VLP et de BV produits d'une part, et établir le potentiel de moduler leur ratio (en faveur des VLP) d'autre part, sont donc des impératifs pour le développement d'un procédé viable à grande échelle.

Au niveau de la quantification de ces particules, le degré de pureté est un paramètre important à considérer. Ceci est critique considérant que les expériences menées sur les VLP prennent en compte la quantité de protéines totales et négligent donc la présence probable de contaminants protéiques dans le produit final. De même, certains investigateurs considèrent la quantité de HA comme étant l'intégralité des glycoprotéines liées aux membranes virales, ignorant la possibilité de retrouver des protéines libres dans la solution finale [104-106]. Il semble donc nécessaire

d'estimer cette proportion de HA libres par rapport aux HA liées afin de pouvoir la considérer ou non comme négligeable. C'est pourquoi, il apparaît important de développer une méthode analytique fiable et rapide et de caractériser précisément le produit final afin de comparer judicieusement les avantages et inconvénients des différentes étapes de production et quantification utilisées.

Dans le cadre de ce projet de recherche et à la lumière des problématiques soulevées, l'accent a été porté tout particulièrement sur la mise en place d'une plateforme de production de VLP ainsi que sur le développement d'une technique de quantification sensible et rapide des composants viraux tels que l'hémagglutinine. Ces deux objectifs s'insèrent dans l'établissement d'un procédé général donnant naissance à de nouveaux types de vaccins à base de VLP contre l'influenza.

De façon plus spécifique, les objectifs ont été scindés en deux parties :

Objectif # 1 : Etudier la production de VLP d'influenza par un système d'expression utilisant des baculovirus recombinants.

- Détermination de conditions de production menant à des quantités détectables de VLP avec un système baculovirus recombinants-cellules d'insectes (concentration cellulaire à infection, rapport entre les trois baculovirus recombinants exprimant les protéines virales, temps de récolte, traitement post-récolte, etc.).
- Purification des VLP produites en cellules d'insectes et caractérisation de leur qualité/pureté par SDS-PAGE, Western-Blot, microscopie électronique, test d'hémagglutination et quantification des protéines totales.

Objectif # 2 : Développer une approche applicable pour la quantification des VLP :

- Développement d'une méthode de quantification de l'hémagglutinine du virus influenza par HPLC en phase inversée
- Évaluation de la précision et de la robustesse de la technique de quantification (limites de détection et de quantification, répétabilité, stabilité de l'échantillon, courbe standard).
- Mise en application de la méthode pour la quantification de VLP durant les différentes étapes de purification.

## CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 4.1 Production des stocks viraux

#### 4.1.1 Maintenance et culture de cellules d'insectes

Pour les productions de VLP et de baculovirus recombinants, les cellules d'insectes Sf9 (Invitrogen), dérivées de *Spodoptera frugiperda* et les cellules d'insecte High Five (BTI-TN-5B1-4) (Invitrogen), dérivées de *Trichoplusia ni*, sont respectivement cultivées dans les milieux Sf900-II (Invitrogen) et High Five (Invitrogen). Les cellules sont maintenues entre  $0,5 \cdot 10^6$  et  $4 \cdot 10^6$  cellules/mL dans des erlenmeyers en polycarbonate de 125 et 250 mL avec bouchon plat (Corning incorporate®).

#### 4.1.2 Production des stocks de baculovirus recombinants

La production de trois baculovirus exprimant chacun les gènes d'influenza HA, NA et M<sub>1</sub> se fait dans des cellules d'insectes Sf9. Ces baculovirus ont été gracieusement fournis par le laboratoire de R. Grabherr (Université des ressources naturelles et des sciences vivantes appliquées, Vienne, Autriche). Chaque construction a été développée au départ d'un plasmide pBac PAK8 possédant un promoteur CMV complet ainsi qu'un promoteur p10. Le premier est dédié à l'expression des gènes en cellules de mammifères, alors que le second permet cette expression dans les cellules d'insectes. Un gène de résistance à l'ampicilline a été rajouté ainsi que le gène d'influenza désiré. HA et NA sont dérivées de la souche A/New Caledonia/20/99 (H1N1) alors que M<sub>1</sub> provient de la souche A/Udorn/307/72 (H3N2). Les cartes des constructions se retrouvent en Annexe 1.

Bien que les conditions de culture (concentration cellulaire à infection, volumes, MOI,...) puissent varier, le principe est équivalent. A une concentration cellulaire désirée, une concentration définie en stock viral est ajoutée à la culture cellulaire, définissant la multiplicité d'infection (MOI = ratio particules infectieuses/cellules). L'infection est ensuite suivie par

comptage cellulaire (ralentissement/arrêt de la croissance cellulaire, augmentation du diamètre des cellules, diminution graduelle de la viabilité). La fin de la culture est définie soit par la viabilité (p. ex. 65%) soit par un temps spécifique de culture post-infection. Le surnageant de culture est alors clarifié par une centrifugation de 10 min à 1000 g. Les stocks de baculovirus sont conservés à 4°C.

### **4.1.3 Test de productivité des stocks de baculovirus**

Ici, la capacité et l'efficacité des baculovirus à transférer les gènes d'influenza qu'ils portent et d'activer la production protéique, sont testées. Pour ce faire, les cellules Sf9 sont infectées à une concentration cellulaire de  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL et avec une MOI de 10 pour les infections simples ou de 3,3 dans le cas des coinfections triples. Les surnageants de culture sont concentrés 10 x à l'aide de tubes de centrifugation Amicon Centricon ayant une taille de pores de 10 kDa (HA et NA) ou de 3 kDa ( $M_1$  et triple infection). Les culots cellulaires (20 mL), préalablement lavés avec du PBS, ont subi un traitement au Triton X-100 0,5% pendant 3 heures à 37°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 1000 g pour enlever les débris cellulaires.

## **4.2 Production des particules pseudo-virales en cellules d'insectes**

L'obtention de VLP a été testée via l'infection de cellules d'insectes avec les trois baculovirus exprimant les protéines virales HA, NA et  $M_1$ . Les stocks de BV sont rajoutés à des cultures cellulaires de concentrations allant de 1 à  $4 \cdot 10^6$  cellules/mL, à des MOI de 1 à 10 et ce avec des rapports variables entre les trois stocks (le but étant de mettre en évidence le rapport des 3 BV optimal en termes de production). Dans cette technique, les cellules d'insectes Sf9 et High Five sont cultivées suivant les paramètres décrits dans le § 4.1.1. Les cultures sont faites également à différentes échelles selon les analyses subséquentes. Lorsque les productions sont concentrées, les volumes sont au minimum de 250 mL dans un erlenmeyer de 1,0 L.

## 4.3 Étapes de concentration et purification

### 4.3.1 Concentration par coussin de sucrose

Le surnageant de culture, exempt de cellules et de débris, est concentré par ultracentrifugation (Ultracentrifugeuse Discovery™ 100SE et rotor A-621) (Thermoscientific) par coussin de sucrose. 22,5 mL de sucrose à 25% sont ajoutés à 225 mL de surnageant. Les échantillons sont centrifugés pendant 3 heures à 4°C à une vitesse de 15 000 rpm. En fin de cycle, les virus sont resuspendus dans le volume désiré (par exemple 4,5 mL pour obtenir une concentration de 50 x) du tampon Tris-HCl 20mM à pH 7,5 contenant 5% de sucrose et 2mM de chlorure de magnésium. De la Benzonase (EMD) est ajoutée au stock viral à une concentration finale de 10 U/mL. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C et finalement filtré à 0,45µm (Acrodisc). La benzonase est une endonucléase qui clive les fragments d'ADN et d'ARN en petits fragments, ce qui limite la contamination du stock viral.

### 4.3.2 Purification par gradient d'iodixanol

Les échantillons concentrés par coussin de sucrose sont ensuite purifiés par ultracentrifugation par gradient d'iodixanol ((5,5'-[(2-hydroxy-1-3 propanediyl)-bis(acetomino)] bis [N,N'-bis(2,3dihydroxypropyl-2,4,6-triiodo-1,3benzene-carboxamide)]) à 60% (AXIS-SHIELD PoC AS). Cette méthode de purification sépare les différents composés se trouvant dans l'échantillon en fonction de leur densité. Pour ce faire, à 11 mL d'une solution d'iodixanol à 25,5 %, 3 mL d'échantillon concentré sont mélangés. Les préparations sont centrifugés pendant 6 heures à 4°C à une vitesse de 64 000 rpm (Ultracentrifugeuse Discovery™ 100SE et rotor A-621) (Thermoscientific). En fin de cycle, les fractions de densité différente sont récoltées par volume de 1 mL (13 fractions au total). La densité est maximale au fond du tube et décroît progressivement. Celle-ci peut être calculée par mesure du poids du tube avant et après collection (g/mL).

## 4.4 Méthodes de quantification spécifiques aux baculovirus

### 4.4.1 Quantification des particules totales par cytométrie de flux

L'une des méthodes disponibles pour mesurer la quantité de particules totales est la cytométrie de flux (couramment nommée FACS) [107]. La technique se base sur la mesure du signal donné par un marqueur fluorescent, le Syber Green I, lié à l'ADN des baculovirus. Plus la concentration en baculovirus est élevée, plus le signal est intense. Pour obtenir les titres viraux, les échantillons sont fixés avec du paraformaldéhyde (Polysciences) (concentration finale de 0.041%) pendant 1 heure à 4°C. Après une perméabilisation de 5 min de la membrane virale des échantillons avec du Triton X-100 (Sigma), leur génome est marqué par du Syber Green I (Invitrogen) (concentration finale de 50x). Suite à deux dernières étapes d'incubation à chaud et à froid, l'échantillon est prêt pour l'analyse.

### 4.4.2 Quantification des particules totales par marquage au Syber Green I (HPLC)

Une méthode développée par Transfiguracion *et al.* [108] permet de quantifier les particules de baculovirus. Elle a pour but de remplacer la méthode traditionnelle de mesure par FACS qui est plus fastidieuse. La concentration en baculovirus est déterminée par HPLC grâce à l'établissement d'une courbe standard contenant une série de dilutions de concentrations connues. Le pic de baculovirus est mis en évidence par la mesure du signal du Syber Green I, lié à l'ADN du virus, via un détecteur à fluorescence (479nm ( $\lambda_{ex}$ )/520nm ( $\lambda_{ém}$ )) placé en sortie de colonne. Les échantillons sont traités avec la solution de Syber Green I à une concentration finale de 2 x et incubés à 37°C pendant 1 heure dans le noir. Les conditions d'élution ainsi que d'autres informations spécifiques à la technique sont reprises en Annexe 2.

### 4.4.3 Test d'infectivité des baculovirus (Titerless)

Le test d'infectivité des baculovirus, encore appelé Titerless, est une méthode de remplacement du test d'infectivité TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infective Dose 50%) développée par Hopkins *et al.* [109]. L'avantage de cette méthode réside dans le mode de détection des cellules infectées. En effet, elle utilise des cellules transformées, Sf9-ET/GFP, qui, lorsqu'infectées par un ou plusieurs baculovirus, expriment la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette expression rend plus facile la lecture des échantillons. Le titrage des virus se fait donc par la mesure de la présence de GFP dans les puits. Des dilutions sériées permettent de déterminer le titre exact par dilution limite (dilution minimale où il n'y a plus de virus dans la préparation). Les stocks en baculovirus sont donc dilués dans des plaques 96 puits avec du tampon Tris. Des cellules Sf9-ET/GFP sont ensuite ajoutées à une concentration cellulaire de  $7,5 \cdot 10^5$  cellules/mL. Cinq jours post-infection, les plaques sont lues sous microscope à fluorescence. Les puits infectés par les baculovirus permettent de déterminer le titre en particules infectieuses présentes dans l'échantillon tel que décrit dans l'Annexe 3.

## 4.5 Méthodes d'identification et de quantification liées au virus influenza

### 4.5.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-Blot (WB)

Pour l'analyse par SDS-PAGE/Western Blot, les échantillons de culture cellulaire sont réduits avec du DTT et traités selon les protocoles en Annexes 4 et 5. Le SDS-PAGE est réalisé avec des gels Mini-Protean TGX 4-15% dans une cellule d'électrophorèse Mini Protean II. La migration débute à 70 volts pendant 10 minutes et finit par un cycle de 60 minutes (ou moins, en fonction de la vitesse de migration) à 140 volts. 5µL de marqueur de poids moléculaire en kDa, standard non-coloré Broad Range (BioRad) ¼ dilué et réduit comme les échantillons, nous permet d'identifier les bandes. Pour l'analyse par western-blot, un marqueur de poids moléculaire



exprimé en kDa spécifique, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas), est utilisé.

Les bandes séparées sont ensuite transférées par WB sur une membrane en nitrocellulose Hybond™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) durant 60 minutes à 10 volts. Après blocage de la membrane par une solution de lait 5 %, l'anticorps primaire est rajouté. Différents anticorps sont utilisés dans ces travaux à la dilution 1:1000 et incubés toute la nuit à température ambiante:

- Anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz - Sc80550)
- Anticorps monoclonal de souris anti-M<sub>1</sub> (Abcam - ab22396)
- Sérum d'anticorps de mouton dirigé contre la souche A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (NIBCS - 03/242)
- Anticorps monoclonal de souris anti gp-64 (eBioscience - 14-6995)

Les anticorps secondaires anti-souris et anti-mouton, dilués 1:1000, sont couplés à la peroxydase de raifort (HRP) et produits respectivement chez le lapin et chez l'âne (Sigma).

#### **4.5.2 Microscopie électronique à coloration négative (NSEM)**

La microscopie électronique a été largement utilisée pour l'étude de tissus vivants, de cellules, de virus [110, 111]. Son application dans les milieux de recherches et médicaux est donc fortement répandue. Dans le cas présent, un échantillon provenant de la purification par iodixanol, fraction # 3, est analysée par microscopie électronique à coloration négative (NSEM). L'échantillon est fixé toute la nuit à 4°C par une solution tamponnée de cacodylate contenant 2,5 % de glutaraldéhyde à pH 7,2. Le jour suivant, l'échantillon est rincé avec du tampon cacodylate contenant 3 % de sucrose (15-30 minutes chacun). L'échantillon est enfin enrobé pour le protéger lors des manipulations. À la fin de ces différentes étapes, la grille contenant l'échantillon peut être analysée par microscopie électronique.

### **4.5.3 Quantification des protéines totales**

La détermination de la concentration en protéines totales dans les échantillons est une analyse classique. Le test est réalisé à l'aide d'un kit commercial, RC/DC (BioRad), compatible pour les préparations à base de particules virales. En fin de traitement par les divers réactifs du kit, l'absorbance des échantillons et standards (différentes concentrations de sérum d'albumine bovine) est lue par spectrométrie à 750 nm. La courbe standard permet de retrouver les concentrations des échantillons en fonction de l'absorbance lue.

### **4.5.4 Test d'hémagglutination (test HA)**

Le test d'hémagglutination évalue la capacité des hémagglutinines présentes sur les membranes virales à maintenir en suspension des globules rouges (de poulet généralement) [81, 82, 84]. L'analyse donne une valeur d'activité hémagglutinante (unités HA/mL). Les stocks viraux sont dilués en série dans des plaques 96 puits. Les dilutions sont telles que l'intervalle de valeur est de 0,15 log unités HA/mL. Une solution de globules rouges frais (Charles River) à une concentration de  $2 \cdot 10^7$  cellules/mL est ajoutée aux dilutions virales. La limite de détection du test est de 0,15 log unités HA/mL avec un écart-type accepté de 0,2 log unités HA/mL.

### **4.5.5 Quantification de l'hémagglutinine d'influenza par RP-HPLC**

Pour la mise en place de la méthode de quantification des protéines HA présentes sur les virus d'influenza par RP-HPLC, la génération d'un stock viral suffisant était requise. Ceci a permis de travailler sur cette technique avec le même stock et d'obtenir ainsi des résultats significatifs.

#### 4.5.5.1 Souches virales d'influenza

Les virus d'influenza A/PR/8/34 (H1N1) (VR-1469), A/WS/33 (H1N1) (VR-1520), A/Aichi/2/68 (H3N2) (VR-1680), A/Hong Kong/8/68 (H3N2) (VR-1679) et B/Lee/40 (VR-1535), ont été adaptés dans les MDCK ou des cultures en tissus et ont été obtenus du Centre de Bioresource Global ATCC. Toutes les souches ont été ensuite amplifiées dans les cellules HEK-293SF-3F6.

#### 4.5.5.2 Production et purification d'un stock viral en bioréacteur de 3,5-L

Un stock de virus influenza A/PR/8/34 a été produit dans un bioréacteur de 3,5-L Chemap de type SG. Les conditions de culture sont similaires à celles présentées dans les productions antérieures en mode batch [13], avec un volume utile de 3-L, une agitation de 80 rpm et une température de 37°C avant infection et de 35°C après infection. La concentration cellulaire à inoculation dans le milieu HyQ est de  $0,65 \cdot 10^6$  cellules/mL et la concentration avant infection atteint une densité de  $3,35 \cdot 10^6$  cellules/mL. À infection, un stock d'influenza de  $5,3 \cdot 10^{10}$  PVI/mL [112] a été ajouté avec 1 µg/mL de trypsine TPCK (Sigma) pour donner une MOI de 0,01. 48 heures post-infection (hpi), la température est augmentée à 37°C et de la benzonase (EMD) à une concentration finale de 10 U/mL est ajoutée pour une incubation de 60 min. Lors de la récolte, les cellules sont éliminées du surnageant par centrifugation (10 min à 2000 rpm). Le surnageant est alors centrifugé par coussin de sucrose de 25 % (3 heures à 15 000 rpm) et les culots viraux resuspendus dans du tampon Tris contenant des agents stabilisant pour obtenir des facteurs de concentration de 10, 25, 50 et 100 fois.

#### 4.5.5.3 Préparation des échantillons pour la RP-HPLC

Comme décrit dans les références mentionnées en introduction (§ 2.5.4), l'étape de préparation des échantillons pour l'HPLC est cruciale. En effet, une diminution du signal du pic de HA1 a été observée lorsque des tubes et inserts de fioles d'HPLC autres qu'en polypropylène étaient utilisés. Il a également été démontré que les ajouts de trypsine et d'iodoacétamide n'étaient pas requis pour assurer une stabilité du pic HA1, contrairement à ce qui avait été premièrement

rapporté par Kapteyn [95]. Ainsi, pour des échantillons purs (préparations vaccinales), semi-purifiés ou de culture, la première étape consiste à une incubation avec du détergent Zwittergent 3-14 (concentration finale de 1%) (Calbiochem) pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite réduits par du dithiothréitol (DTT) (Sigma) à une concentration finale de 22,7mM durant 5 min à 95°C. Enfin, le produit est centrifugé et filtré sur une membrane 0,22µm.

#### **4.5.5.4 Conditions d'opération du système d'HPLC**

Le système HPLC est constitué d'un chromatographe Infinity Series 1260 d'Agilent équipé d'une pompe quaternaire et de détecteurs UV à Diode Array (fixé à 214 nm) et à fluorescence (fixé à 280nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ )/335nm ( $\lambda_{\text{ém}}$ )). Le logiciel de traitement des données fourni avec l'HPLC est Chemstation. La séparation se fait avec une colonne à phase inversée non-poreuse en silice MICRA NPS-ODSI 4,6 mm x 33 mm, particules de 1,5µm (Eprogen). Les phases mobiles sont composées de 0,1% TFA dans l'eau Milli-Q (A) et 0,1% TFA dans de l'acétonitrile (B). Le gradient d'élution débute avec un rapport de 68/32 entre les phases mobiles A et B. L'élution passe de 32 à 50 % de B en 5 min, de 50 à 95 % en 1,5 min, 4 min stationnaire à 95 % de B, et un retour à la phase mobile initiale en 0,5 min. La méthode est complète en 15 min. Préalablement à toute analyse, la colonne est équilibrée avec les deux solvants. Toutes les injections sont réalisées avec une température de colonne stable de 60°C.

#### **4.5.5.5 Collecte des pics, SDS-PAGE et Western Blot**

Afin d'identifier les pics observés sur les chromatogrammes, l'échantillon utilisé comme standard a été collecté en plusieurs fractions. Après évaporation de l'acétonitrile à 60°C, les fractions sont concentrées et lavées de toute trace de TFA par filtration à l'aide d'une colonne YM-10 (Millipore). Elles sont alors analysées par SDS-PAGE sous condition non-réductrice (l'étape de réduction étant faite par le DTT lors de la préparation des échantillons pour l'HLC) avec des gels préparés mini-PROTEAN® TGX™ 4-15% (BioRad). Les bandes de protéines sont révélées par coloration à l'argent. Une analyse Western Blot est également réalisée en présence d'un sérum anti-influenza A/PR/8/34 (NIBSC).

## CHAPITRE 5    RÉSULTATS

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus lors de ces travaux et ce, tant pour la production des VLP que pour l'élaboration d'une méthode de quantification de l'hémagglutinine d'influenza. En ce qui concerne la production, une première section décrit les expériences réalisées en vue de l'obtention de VLP en cultures de cellules d'insectes. L'identification et la caractérisation de ces particules produites sont ensuite discutées. Par après, diverses tentatives d'optimisation des conditions de production des VLP en cellules d'insectes sont présentées. Enfin, une dernière section décrit le développement d'une technique de quantification de HA par HPLC en phase inversée et démontre son application pour l'analyse du surnageant d'échantillons prélevés directement de cultures cellulaires.

### **5.1 Production de VLP d'influenza par le système BV-cellules d'insectes**

La génération de particules pseudo-virales d'influenza a été démontrée par plusieurs groupes de recherche tel qu'évoqué dans la revue de littérature (§ 2.4). Ces VLP ont pu être obtenues par divers systèmes d'expression dont celui utilisant des cellules d'insectes. Suite à l'insertion des gènes exprimant les protéines virales au sein d'un ou plusieurs baculovirus (BV), il est possible d'exprimer les protéines virales telles que l'hémagglutinine, la neuraminidase ou encore la protéine de structure M<sub>1</sub> par infection de cultures de cellules et expression de ces protéines.

Dans le cas présent, la production des VLP a été testée via l'utilisation d'un système baculovirus recombinants-cellules d'insectes. Pour ce faire, les travaux ont été menés avec un stock de trois baculovirus recombinants décrit dans le § 4.1.2.

Afin d'évaluer les niveaux d'expression en protéines pouvant être obtenus par ces stocks, des infections simples (à une multiplicité d'infection de 10) et triple (MOI de 3,3 pour chaque BV) ont été réalisées à petite échelle en flacons agités. Les surnageants et les culots cellulaires récoltés 48 et 64 heures post-infection (hpi) ont été concentrés 10 fois et analysés par Western-Blot (WB).

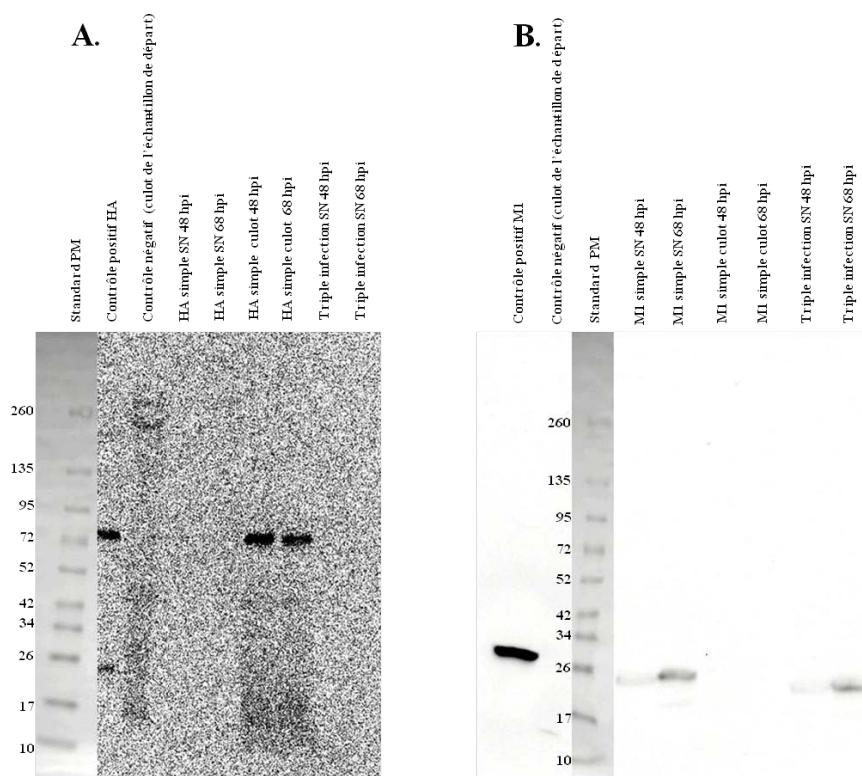


Figure 5.1 : Western-Blot des surnageants et culots cellulaires des productions en simple et triple infections pour HA (A) et M<sub>1</sub> (B). (A) : Anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz – Sc80550) ; (B) : Anticorps monoclonal de souris anti-M<sub>1</sub> (Abcam – ab22396).

Comme le démontrent les résultats présentés dans la Figure 5.1, les stocks de BV se sont avérés aptes pour le transfert de gènes et la production des protéines d'intérêt dans les cellules Sf9. En effet, HA est bien exprimée par les cellules et se retrouve de façon abondante dans les culots (Figure 5.1 – A.). Cette observation s'explique par le fait que HA est une glycoprotéine transmembranaire et donc liée à la membrane cellulaire. Ainsi, il paraît logique de ne pas l'observer dans le surnageant, au contraire de M<sub>1</sub> qui est quant à elle sécrétée dans le surnageant de culture. Au vu des intensités de bandes, il semble que le taux d'expression de M<sub>1</sub> soit plus faible que celui de HA.

Bien que plusieurs anticorps (Ac) différents aient été testés, les Western-Blots réalisés pour la protéine NA n'ont pas montré de bandes, autant dans le cas des échantillons que pour le contrôle. Cette absence de signal peut vraisemblablement s'expliquer par un manque de spécificité des anticorps utilisés (résultats non présentés).

Les résultats obtenus pour la triple infection (MOI de 3,3 pour chaque BV) après concentration, ont également permis de dégager certaines observations. Ainsi,  $M_1$  a présenté des bandes d'intensité similaire à celles observées dans le surnageant de la simple infection. Dans le cas de HA, sa concentration a semblé être trop faible pour être détectée en WB. La présence de HA dans le surnageant étant reliée à celle des VLP, cette première observation pourrait démontrer un faible taux de bourgeonnement des VLP hors des cellules hôtes selon les conditions de production appliquées ici.

## **5.2 Identification et caractérisation des particules pseudo-virales d'influenza produites par des cellules Sf9**

La production d'un stock de VLP, au départ du système BV-cellules d'insectes, a été nécessaire afin d'identifier, caractériser et quantifier ces particules produites. De plus, ces travaux ont permis de mieux cerner les problématiques liées à leur génération.

Pour ce faire, une première tentative de production d'un stock de VLP, essentiellement basée sur les publications de Krammer *et al.* [32, 113], a été réalisée au départ de cellules Sf9 en fiole de 2L (volume utile de 700 mL). À une densité cellulaire de  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL, les trois baculovirus exprimant HA, NA et  $M_1$  ont été ajoutés à la culture à une MOI équivalente de 1. La densité cellulaire et la viabilité ont été suivies durant toute la production et comparées avec une culture contrôle non infectée (Figure 5.2).

68 heures post-infection (hpi) (critère fixé pour la récolte en raison de la faible viabilité cellulaire), une centrifugation a été effectuée dans le but de séparer le stock viral de la biomasse et des débris cellulaires. Une première étape de concentration (50 fois) par ultracentrifugation a permis de séparer la majeure partie des protéines contaminantes des virus par coussin de sucrose 25%. Le culot resuspendu a subi une digestion à la Benzonase, une endonucléase permettant en principe de digérer spécifiquement les fragments d'ADN et d'ARN sans atteindre les protéines présentes dans l'échantillon. La suspension virale a alors été préparée pour une étape ultérieure

d'ultracentrifugation par iodixanol. Cette étape donne lieu à un fractionnement de l'échantillon en fonction de la densité des particules s'y trouvant. Suite à ces opérations, diverses expériences dédiées à l'identification, à la caractérisation et à la quantification des pseudo-particules virales ont pu être réalisées.

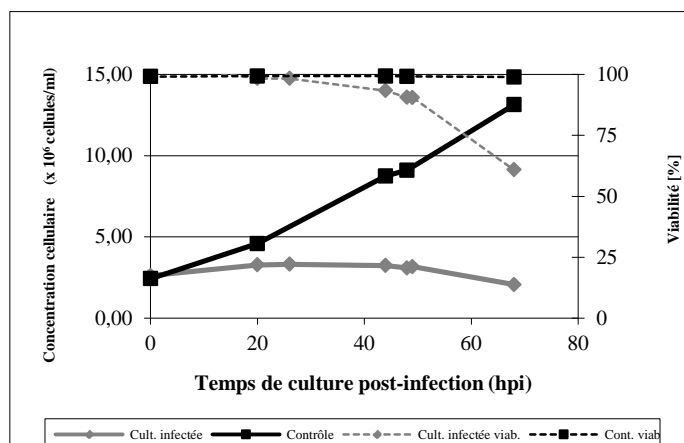


Figure 5.2 : Cinétiques de croissance pour des cultures non-infectée et infectée avec les trois baculovirus pour la production de VLP.

Suite à l'analyse par SDS-PAGE des échantillons provenant des différentes étapes de concentration et de purification par iodixanol (Figure 5.3 - A), on peut estimer le degré de pureté de ceux-ci et noter l'évolution du profil en protéines totales. Ainsi, la fraction # 1, extrêmement dense en iodixanol, présente une bande très étroite et faible en protéines en comparaison à la fraction # 2, bande la plus abondante en protéines. Ceci se confirme avec le WB (Figure 5.3 - B) où des bandes significatives identifiant HA sont uniquement détectées dans le concentré 50x et les fractions # 2 et # 3. Dans les fractions # 4 à 7, la quantité de protéines est de plus en plus faible, mais ces fractions présentent néanmoins une légère bande pour HA. Enfin, les fractions # 8 à 13 n'ont pas révélé de bandes pour HA (résultats non montrés). Suite à ces premiers résultats obtenus en WB, il a été possible de mettre en évidence un faible taux d'expression pour la protéine HA.



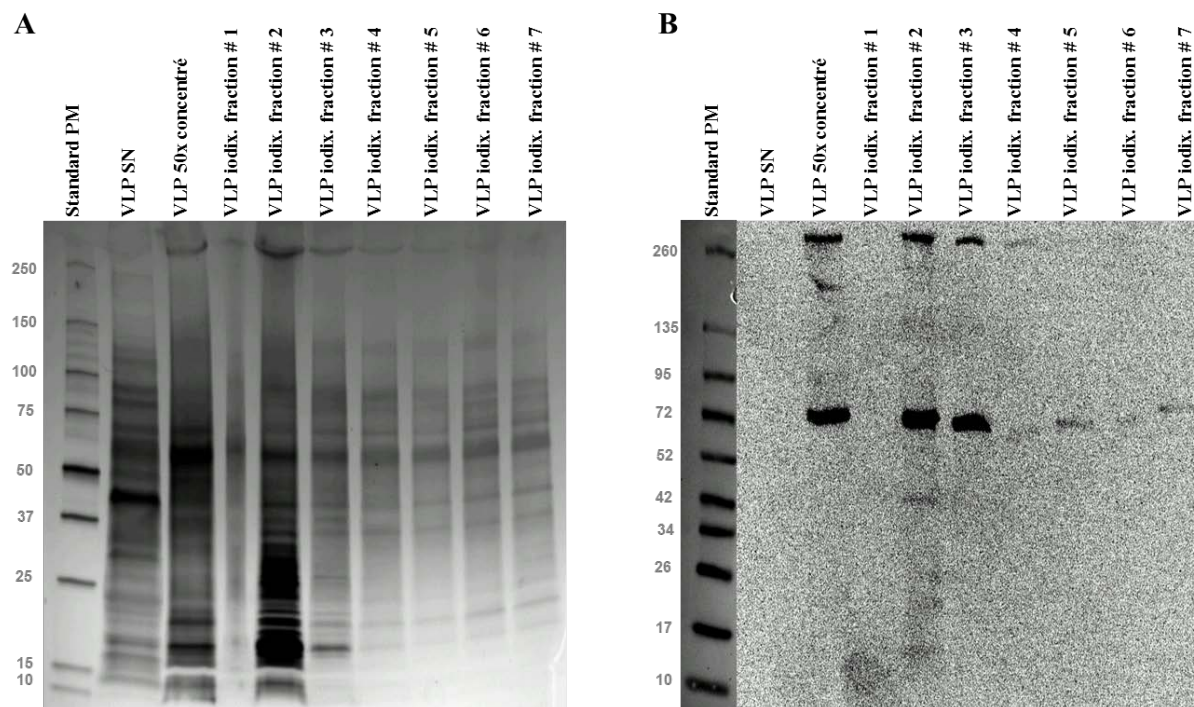


Figure 5.3 : SDS-PAGE (A) et Western-Blot (B) des différents échantillons obtenus au cours du procédé de purification des VLP. (SN : surnageant) WB : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz).

La détermination de la quantité de protéines totales dans les différents échantillons s'est avérée en accord avec les résultats obtenus par SDS-PAGE et WB. Ainsi, après réduction du volume de 50 fois par coussin de sucrose, la concentration en protéines totales a doublé, passant de 0,45 à 0,87 mg/mL. Durant cette étape, la majeure partie des protéines non-liées à des virus, soit plus de 96 %, ne peuvent traverser ce coussin et sont donc éliminées. Ceci met dès à présent en avant les faibles rendements de production, étant donné que seuls moins de 4 % des protéines totales semblent être reliées aux potentielles VLP.

Table 5.1 : Analyse de la teneur en protéines totales et de l'activité hémagglutinante dans les échantillons obtenus durant les étapes de purification des VLP.

	Surnageant	50x conc.	Fractions						
			1	2	3	4	5	6	7
<b>Protéines totales (mg)</b>	306,52	11,71	1,60	4,78	1,35	0,70	0,59	0,53	0,39
<b>Test HA (log UHA/mL)</b>	2,125	3,275	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*

\*n/a : test non-applicable pour ces échantillons

Lors de l'étape de purification par iodixanol, une grande partie des protéines a été concentrée dans les trois premières fractions (soit plus de 65 %) (Table 5.1). La fraction # 2 présente à elle seule 40,84 % des protéines totales se trouvant initialement dans le concentré 50x. Les fractions suivantes ont une quantité de protéines décroissante, et de la fraction # 8 à 14, les quantités mesurées correspondent à moins de 0,70 mg de protéines totales. En termes de rendements, la quantité de protéines initiales au départ de la purification par iodixanol (11,71 mg) est en majeure partie recouvrée dans les fractions (10,62 mg). Le rendement spécifique de cette étape est dès lors de 90,70 % (excluant les erreurs de mesure du test pour les fractions faibles en protéines, pouvant ramener cette valeur encore plus proche de 100 %).

Dans le test HA, seuls les échantillons exempts d'iodixanol ont pu être analysés, car ce composé interfère avec la précipitation des globules rouges (GR) et conduit à des faux positifs (tel que préalablement observé par Le Ru *et al.* [13] et confirmé dans nos expériences). Les activités hémagglutinantes des échantillons provenant du surnageant et du concentré 50 x sont respectivement de 2,12 et 3,27 log UHA/mL, ou encore de 133,35 et 1883,65 unités HA/mL. Considérant le facteur de concentration entre les deux, cela signifie que seulement 28,25 % de l'activité hémagglutinante du surnageant s'est retrouvée dans la fraction concentrée. Cela peut s'expliquer soit par la présence d'un nombre élevé de protéines HA libres dans le surnageant (probablement relarguées dans le surnageant suite à la lyse des membranes cellulaires), soit en raison de particules trop légères, toutes deux incapables de traverser le coussin de sucrose lors de l'étape de concentration.

Étant donné que les échantillons présentaient une activité hémagglutinante, la présence des VLP a été confirmée par microscopie électronique à coloration négative (NSEM). Cette technique permet en outre de comparer la structure de ces particules par rapport au virus sauvage. Ainsi, la fraction d'iodixanol # 3 a été analysée (résultats présentés dans la Figure 5.4).

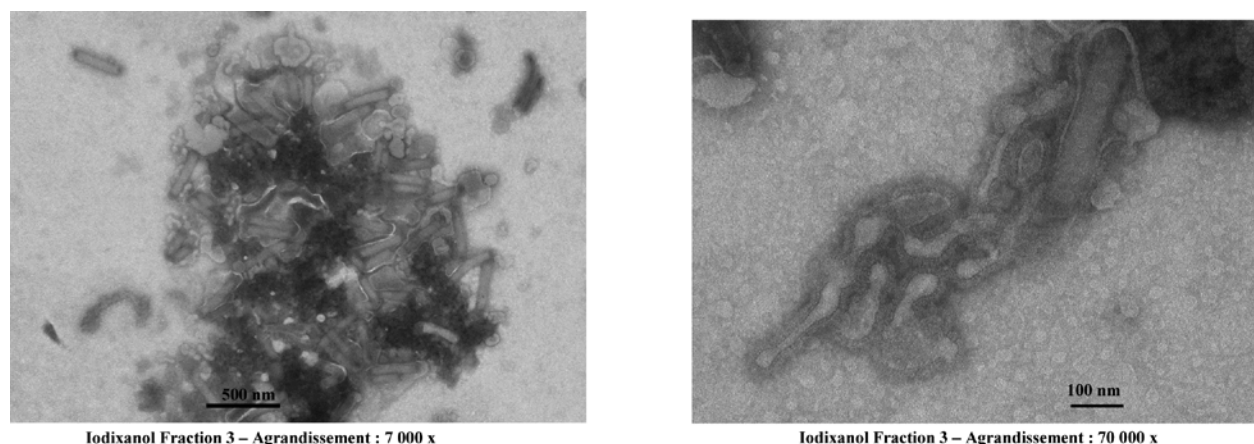


Figure 5.4 : Microscopie électronique à coloration négative (Institut Armand-Frappier – INRS) de la fraction d'iodixanol # 3.

Dès le grossissement à 7.000 x, une large quantité de particules en forme de bâtonnets, morphologie caractéristique des baculovirus, a pu être identifiée et ce pour différentes pages de lame criblées. Aucune particule sphérique n'a pu être clairement mise en évidence à 7.000 x. Toutefois, en augmentant le grossissement à 70.000 x, quelques particules de forme autre qu'en bâtonnets ont pu être observées, toujours avec une large proportion de baculovirus. Bien que cela requière confirmation, il semble que ces particules correspondent à des VLP d'influenza, étant similaires en taille et en forme aux virus sauvages produits antérieurement par Le Ru *et al.* [13].

Ces résultats ont mis en lumière la présence d'une large contamination par les baculovirus (de l'ordre de 100 à 1.000 fois supérieure aux VLP selon les images de NSEM), ce qui pose une difficulté majeure pour la mise en place d'une méthode de quantification des particules pseudo-virales. Initialement, la production devait fournir un stock pur et concentré en VLP, ce qui n'a pas été le cas à ce stade du procédé de purification. C'est pourquoi, une étape de purification supplémentaire a dû être ajoutée avec pour objectif de séparer les deux types de particules et de fournir ce stock pur en VLP.

Pour ce faire, les échantillons ont été analysés avec la méthode initialement développée pour la quantification des baculovirus (§ 4.4.2) ; l'objectif étant d'observer la présence potentielle d'un pic distinct de celui des baculovirus et pouvant être relié aux VLP. L'hypothèse émise ici est basée sur une séparation des deux types de virus grâce à une différence de leurs charges

membranaires. Ainsi, le surnageant, le concentré 50x et la fraction # 3 ont été successivement injectés sur une colonne échangeuse d'anions (Figure 5.5).

Lors de l'élution du pic correspondant aux baculovirus (vers 7,5 min), un épaulement en fin de pic a été observé (principalement pour le surnageant et le concentrât). Cet épaulement peut s'expliquer soit par la présence d'un mélange de baculovirus ayant des propriétés membranaires différentes (différence de charges) ou encore par la présence d'autres types de composés tels que des VLP.

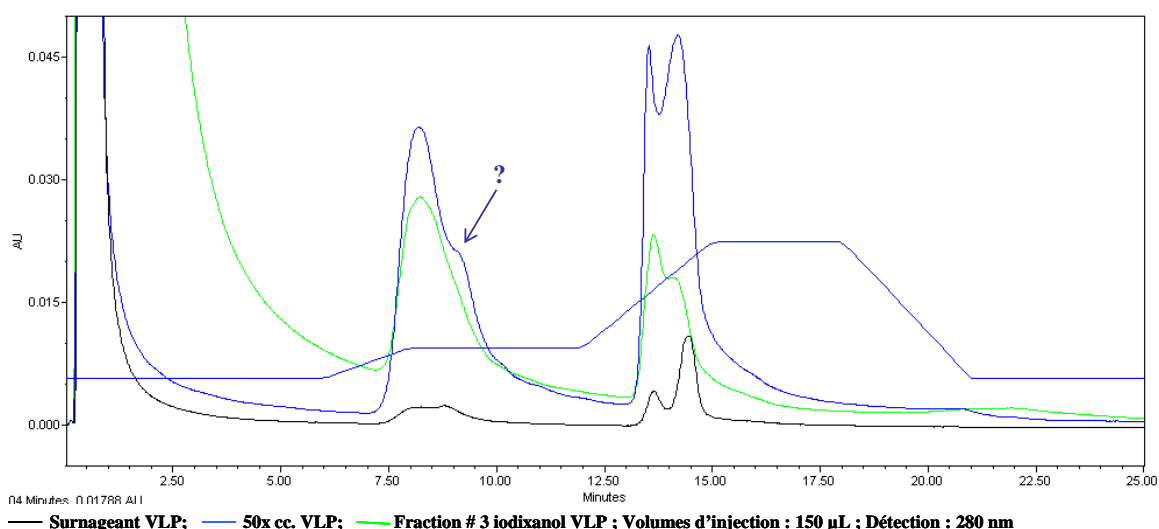


Figure 5.5 : Profils d'élution à 280 nm des différents échantillons obtenus au cours des étapes de purification.

Les différents pics observés à 280 nm ont par la suite été fractionnés afin de confirmer cette dernière hypothèse. Après une étape de concentration, les pics ont été analysés par SDS-PAGE et WB avec des anticorps dirigés contre HA et gp64, protéine membranaire des BV. Le pic d'intérêt, au temps de rétention (RT) d'environ 8,2 min, a été divisé en trois fractions de 1 mL chacune (Figure 5.5).

Si les trois échantillons de départ (avant injection) ont présenté en WB de larges bandes pour la protéine gp64, seules les deux premières fractions du pic de l'échantillon concentré 50x ont dévoilé des bandes pour cette protéine (Figure 5.6 - A). Ceci signifie que l'épaulement observé (fraction # 3) n'est possiblement pas relié à gp64. Lorsque ces mêmes fractions ont été mises en

contact avec l'anticorps dirigé contre HA (Figure 5.6 - B), aucune bande n'a été observée et ce pour les trois échantillons (surnageant, concentré 50x et iodixanol # 3).

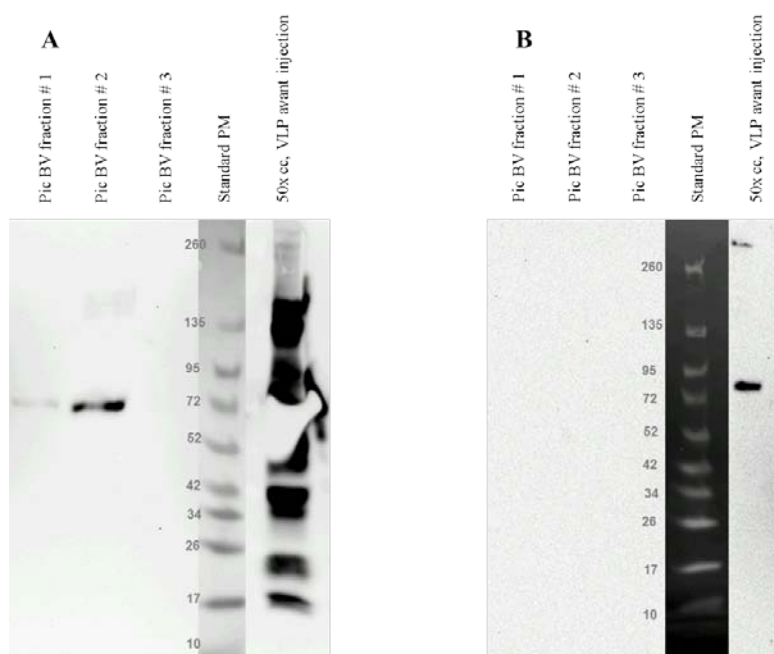


Figure 5.6 : Western-Blots pour les différentes fractions du pic éluant à 7,5 min de l'échantillon 50x cc. (A) : anticorps monoclonal de souris anti-gp64 (eBioscience) (B) : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz).

Nous pouvons donc en conclure que, dans cette expérience, soit la concentration en HA récoltée est trop faible pour être détectée en WB, soit il n'y a pas de HA dans ces fractions. Or, nous savons que les échantillons initiaux (avant injection) comportent de l'hémagglutinine, mais en concentration bien plus faible par rapport à gp64 si on considère l'intensité des bandes détectées par WB. Ceci confirme donc la large présence de BV par rapport aux VLP potentiellement présentes. Une autre explication réside dans l'existence probable de HA au sein l'enveloppe des BV, étant donné que les BV et les VLP sont tous deux des virus « bourgeonnants ». Lors de cette étape de bourgeonnement, une compétition dans le processus de sortie des deux virus d'une part et un entraînement de protéines d'influenza par les BV d'autre part pourraient se produire (comme préalablement discuté dans le Chapitre 3). La première limiterait le nombre de VLP extraites des cellules, alors que le deuxième entraînerait HA ou NA sur l'enveloppe du BV. Cette incorporation dans le BV pourrait expliquer la présence d'une bande pour HA dans nos WB et la mesure d'une activité hémagglutinante. En effet, un mélange 1 : 1 : 1 en BV, non-concentrés et

utilisés pour la génération de VLP, a démontré une activité HA de l'ordre de 1,75 log unités HA/mL.

Ces hypothèses ont dès lors mené à un criblage plus poussé des conditions de production des VLP en cellules d'insectes afin de réduire la contamination en BV et augmenter le taux de production des VLP.

### **5.3 Étude des facteurs susceptibles d'influencer le rendement en VLP d'influenza en cellules d'insectes**

Le faible taux de production couplé à la contamination en BV a mis en évidence la nécessité d'optimiser le système de production baculovirus recombinants/cellules d'insectes.

Plusieurs essais d'optimisation de production, par modifications de certains paramètres, en cellules d'insectes (Sf9 et High Five) ont été réalisés afin d'évaluer les taux de production de VLP et de baculovirus. L'analyse des essais a été effectuée par Western-Blot utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre HA et gp64. Bien qu'essentiellement qualitative, la méthode permet néanmoins de détecter une tendance en termes de niveaux d'expression de ces protéines. L'accent a donc été mis sur la possible identification d'une condition permettant d'augmenter significativement l'expression de HA en parallèle d'une diminution voir d'une absence de bande pour la protéine gp64.

Selon la littérature, les paramètres de production susceptibles d'influencer le rendement en VLP sont multiples. Dans cette série d'essais, le type de lignée cellulaire, la concentration cellulaire à infection, la MOI utilisée pour chaque baculovirus recombinant, l'heure de récolte ou encore les étapes de traitement post-récolte ont été testés.

### **5.3.1 Influence du temps de récolte sur la production des VLP**

Une première expérience a évalué l'impact du temps de récolte sur les quantités de HA et gp64 présentes dans le surnageant de culture et les fractions concentrées 100x. Ainsi, une culture de Sf9 a été infectée à  $2.10^6$  cellules/mL avec une MOI de 3,3 pour chaque BV (MOI totale de 10). Des échantillons du surnageant de culture ont ensuite été prélevés pour plusieurs temps post-infection (24 – 36 – 48 – 54 – 60 – 72 hpi). Les surnageants de culture et les concentrats 100x ont ensuite été analysés par SDS-PAGE et WB pour HA et gp64. Après analyse par WB, Il est apparu que les niveaux d'expression de HA étaient assez faibles. Ainsi, aucune bande n'a été observée pour HA dans les surnageants, au contraire de gp64 qui a été détectée dès 24 hpi dans le surnageant de culture. Les fractions concentrées possédaient également des quantités détectables de HA et gp64 avec une proportion importante pour cette dernière. Cette première tentative a donc permis de confirmer que le temps de récolte influence les quantités de virus obtenues (plus le temps de culture est long, plus les cellules ont de temps pour produire les virus) sans toutefois démontrer une diminution effective de la contamination en BV.

### **5.3.2 Impact de la Neuraminidase sur le relargage des VLP dans le surnageant de culture**

L'absence de quantités importantes en VLP pourrait s'expliquer par la perte de celles-ci lors des étapes de purification et principalement lors de la clarification du surnageant durant laquelle les cellules sont éliminées. L'hypothèse émise ici est que les VLP peuvent être retenues au niveau de la membrane cellulaire par agrégation avec les hémagglutinines ou encore les récepteurs acides sialiques, tous deux présents au niveau de la membrane cellulaire. C'est pourquoi une seconde tentative a exploré la mise en contact des cellules avec de la neuraminidase. Dans le cycle infectieux du virus, la neuraminidase (NA) clive les récepteurs acides sialiques, directement reliés à l'entrée du virus dans la cellule, afin d'empêcher ces récepteurs de retenir le virus au niveau de la membrane cellulaire et ainsi permettre sa dispersion à travers les cellules voisines [31].

Les cellules Sf9 ont été infectées à une densité de  $2.10^6$  cellules/mL avec différentes MOI pour les trois baculovirus. Les rapports utilisés sont présentés dans la Table 5.2. Des additions de neuraminidase (concentration finale de 1,25 ng/mL) (R&D Systems) ont été réalisées à 24 et 70 hpi et comparées à des cultures contrôles (pas d'ajout de NA). Après récolte à 71 hpi, les échantillons correspondant à ces 12 conditions ont été concentrés 50x.

Table 5.2 : Conditions de culture testées pour l'évaluation de l'impact de la neuraminidase, en présence de différents rapports entre les trois baculovirus, sur la production des VLP

HA/NA/M <sub>1</sub>	Pas de NA	24 hpi	70 hpi
2/2/2	1	2	3
2/2/10	4	5	6
2/10/2	7	8	9
2/10/10	10	11	12

Suite à leur analyse par WB, la présence de gp64 a été remarquée de façon importante (Figure 5.7 - A). Parallèlement, HA n'a été détectée que faiblement dans toutes les conditions testées, soulignant le faible impact de l'ajout de la neuraminidase sur la relâche potentielle de VLP (Figure 5.7 - B).

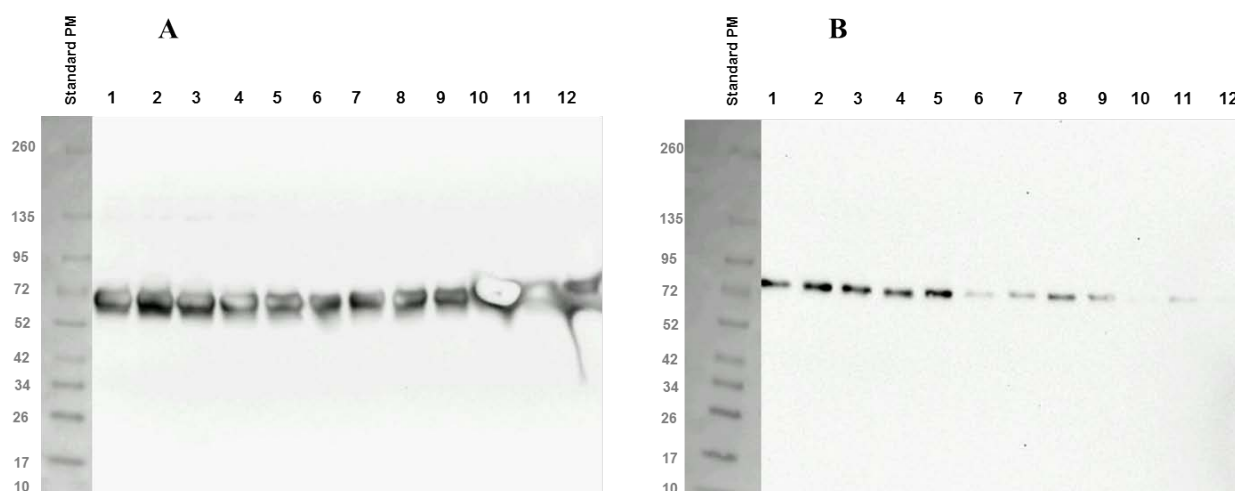


Figure 5.7 : Western-Blots pour les différentes conditions de culture testées en présence de NA (A) : anticorps monoclonal de souris anti-gp64 (eBioscience) (B) : anticorps monoclonal de souris anti-HA (Santa-Cruz).



Ces résultats démontrent qu'à la concentration utilisée, la neuraminidase n'influence pas significativement les taux de production de VLP ou encore que la protéine n'a aucun effet sur la relâche des VLP produites par les cellules Sf9 dans le milieu de culture. Également, la modification des rapports entre les trois baculovirus n'a pas présenté de variations significatives entre les conditions criblées.

### 5.3.3 Influence des étapes de traitement et de purification du surnageant sur la qualité et les quantités de VLP obtenues

L'ajout de Neuraminidase n'ayant pas fourni d'améliorations significatives dans la production de VLP, l'accent a été mis sur le traitement de la culture cellulaire juste avant clarification, et ce pour des cultures avec les cellules Sf9 et High Five. Conservant l'hypothèse selon laquelle une large partie des VLP serait éliminée lors de l'étape de clarification du surnageant, des traitements à la Benzonase ainsi qu'au Triton-X 100 ont été réalisés et comparés à un échantillon contrôle sans prétraitement. L'ajout de ces composés dans le surnageant de culture pourrait avoir un impact sur la relâche des virus ségrégués au niveau de la membrane cellulaire. Également, l'étape de clarification par centrifugation a été comparée à une étape par filtration (Table 5.3).

Table 5.3 : Détails des différents traitements réalisés sur les productions de VLP en cellules Sf9 et en cellules High Five.

	Prétraitement par:	Clarification par:
A	Benzonase (10U/mL) (1h à 37°C)	centrifugation
B		filtration
C	pas de traitement	centrifugation
D		filtration
E	Triton-X 100 (0,005%) (1h à 37°C)	centrifugation
F		filtration

Les conditions ont été évaluées pour les surnageants de culture ainsi que pour les concentrats 50x. Les analyses par WB de HA ont à nouveau présenté des résultats similaires pour toutes les

conditions à ceux préalablement présentés en Figure 5.7 . Ainsi, des bandes ont été obtenues pour HA, mais de façon beaucoup plus faible que pour gp64. Également, aucune différence significative dans les taux de production n'a pu être détectée entre les deux souches de cellules d'insectes. Un manque d'infectivité du rBV-HA est également apparu lors des productions préliminaires servant à la génération des stocks en rBV nécessaires aux essais de production (Annexe 6). Ceci a donc soulevé une autre problématique qui a compromis la poursuite des expériences liées à la production de VLP en cellules d'insectes.

## **5.4 Quantification de l'hémagglutinine d'influenza par HPLC en phase inversée (RP-HPLC)**

Pour supporter la mise en place et le développement d'une éventuelle plateforme de production de VLP d'influenza, l'élaboration d'une technique de quantification alternative pour l'hémagglutinine (HA) d'influenza a été envisagée. Les intérêts principaux de cette méthode doivent être sa capacité à remplacer les tests fastidieux que sont le SRID et le test HA, tout en permettant une mesure fiable, rapide et sensible (détection de faibles concentrations en HA dans les surnageants de culture).

Antérieurement, divers groupes de recherche ont présenté des travaux basés sur la quantification de HA par HPLC en phase inversée (RP-HPLC) (§ 2.5.52.5.4). Bien que ces recherches amènent un certain nombre d'indications sur la méthode, un approfondissement général est requis. En effet, dans ces différentes études, seules des analyses effectuées sur des doses vaccinales (soit donc du matériel hautement purifié) ont été rapportées. Dans le cas qui nous intéresse, le matériel étudié est prélevé directement de la culture cellulaire et non concentré. Ceci ajoute des contraintes qui n'ont préalablement pas été abordées dans la littérature.

L'hémagglutinine (HA) est une glycoprotéine très hydrophobe se retrouvant sur la membrane des virus et formant des trimères. La taille d'un monomère varie selon la souche. N'ayant pas pu générer un stock de VLP suffisant pour la mise en place de cette méthode, la souche virale

sauvage de référence A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) a été utilisée. La protéine de cette souche contient 566 AA pour un poids moléculaire de 63,38 kDa, excluant les glycosylations [114, 115].

## 5.4.1 Développement et optimisation de la méthode

### 5.4.1.1 Conditions de séparation, de préparation d'échantillon et identification du pic

Les méthodes traditionnelles d'HPLC en phase inversée utilisent deux types de solvants : un premier aqueux et un second organique. Le constituant principal de la première phase mobile est de l'eau alors que la seconde contient majoritairement de l'acétonitrile (ACN). De l'acide trifluoroacétique (TFA) est ajouté aux deux phases mobiles afin d'augmenter la résolution des pics obtenus. En vue de faciliter les expériences, le choix des phases mobiles a donc été le suivant :

Solvant A : 0.1 % de TFA dans de l'eau Milli-Q

Solvant B : 0.1 % de TFA dans de l'acétonitrile.

Un standard interne du virus de la souche A/PR/8/34 H1N1 a été produit dans le but de mener à terme toutes les expériences avec ce même stock (Table 5.4). Ce standard a été concentré 10 fois et quantifié par test HA (§ 4.5.4). Deux types d'échantillon ont donc été obtenus pour les analyses : le surnageant de culture et le 10x concentré.

Table 5.4 : Quantification par test HA des standards internes de la souche A/PR/8/34 H1N1

	Surnageant	10x cc.
Log unités HA/mL	$4,23 \pm 0,21$	$5,08 \pm 0,13$
unités HA/mL	$1,87 \cdot 10^4 \pm 8,62 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^5 \pm 3,82 \cdot 10^4$

D'après les références [16, 97], deux types de colonne sont capables de fournir des résultats significatifs pour la quantification de HA par RP-HPLC. Toutefois, la préparation de l'échantillon diffère selon les cas et a nécessité une confirmation. Ainsi, la lyse optimale de la

membrane virale par un détergent tel que le Tween80 ou encore le Zwittergent 3-14, l'ajout ou non de trypsine et d'iodoacétamide (IAA) ont été des paramètres à définir avant de pouvoir affiner la méthode.

Une première série d'expériences a été entreprise avec une colonne poreuse en polystyrène POROS® R1/10 (PerSeptive biosystems Inc.), dont l'utilisation a été préalablement rapportée par Kapteyn *et al* [16, 95]. Malgré la mise en œuvre de différentes méthodes de préparations d'échantillon (avec ou sans trypsine/IAA) et de divers profils d'élution, cette colonne n'a pas permis de détecter clairement le pic de HA1. Au vu de ces tests, il s'est avéré que la majeure partie des constituants viraux est fortement retenue par la colonne, ce qui requiert des conditions d'élution extrêmes (100 % de solvant B) (résultats non montrés).

Dès lors, une seconde colonne, utilisée par les chercheurs de Santé-Canada [96, 97] a été testée. Celle-ci est non-poreuse et à base de silice (MICRA® ODS-I, 4,6 mm x 33 mm, 1,5µm particules - Eprogen). Lors des différentes étapes de mise en place de la méthode (préparation d'échantillon et profil d'élution), il est apparu que les ajouts de Zwittergent 3-14 (1% en concentration finale) et de dithiothréitol (DTT) à 22,73 mM final étaient suffisants pour libérer la sous-unité HA1 du reste de la matrice virale et la maintenir stable dans le temps (§ 4.5.5.3). A contrario, l'ajout de Tween-80 a engendré une forte perte de signal du pic d'intérêt par rapport au Zwittergent, ce qui limite la sensibilité de la méthode (résultats non montrés).

L'identification de HA1 et HA2 a été rendue possible par la collecte des pics observés dans les chromatogrammes, suivie par des étapes d'évaporation et changement de tampon/concentration. Les fractions concentrées et exemptes d'ACN et de TFA ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et Western-Blot utilisant un sérum dirigé contre HA (capable de reconnaître les deux sous-unités de la souche Puerto Rico) (Figure 5.8). En plus d'identifier les deux sous-unités de HA, la double analyse a permis de valider le protocole de préparation des échantillons. En effet, dans l'échantillon de départ, seul HA0 sous forme de monomère (~72 kDa) ainsi que de di- et trimères ont été détectés. Suite aux ajouts de Zwittergent et de DTT, toutes les formes de HA0 ont été clivées en HA1 (< 50 kDa) et HA2 (~25 kDa) (bande non montrée dans la Figure 5.8).

Pour le pic correspondant à HA1, la présence d'une deuxième bande a été observée, tant dans le SDS-PAGE que dans le WB. La première bande, de poids moléculaire avoisinant 50 kDa, coïncide bien à HA1. La seconde, de 37 kDa environ, n'a pas pu être identifiée. Plusieurs profils d'élution ont été testés sans succès afin de séparer ces deux bandes. Lors de ces tests, il est apparu que les deux bandes co-éluent et ne sont pas séparables sous les conditions utilisées (colonne, phases mobiles). Toutefois, cette bande est reconnue par l'anticorps et laisse penser qu'elle provient de la dégradation partielle de la sous-unité HA1 lors des expériences (dans la colonne ou lors des étapes subséquentes à la collecte du pic).

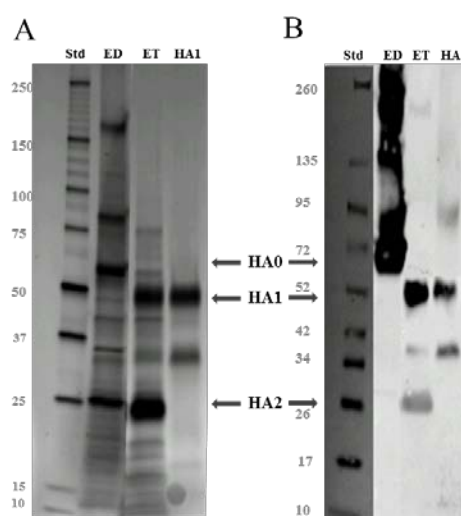


Figure 5.8: A – SDS-PAGE coloration à l'argent; B - WB avec un sérum anti-HA (NIBSC)  
(Std: marqueur de poids moléculaire; ED: échantillon non-traité; ET: échantillon traité)

Au départ du chromatogramme du standard concentré 10x, il a été possible de déterminer la proportion de HA1 par rapport aux autres pics. Ainsi, le signal obtenu pour le pic de HA1 représente environ 5 % du signal des protéines totales de l'échantillon alors que celui pour HA2 représente un peu plus de 2 %.

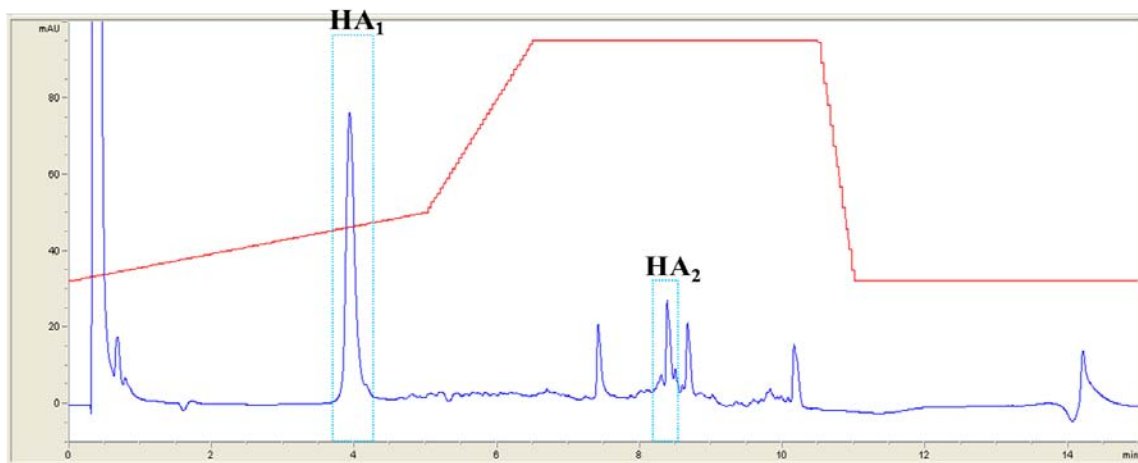


Figure 5.9 : Profil d'élution obtenu à 214 nm pour le standard interne A/PR/8/34 10x cc. (injection de 10  $\mu$ L).

Suite à l'identification du pic de HA1, la méthode d'élution a été optimisée afin d'une part, d'éluer HA1 sans autre pic interférant (TR  $\sim$  4 min), et d'autre part, de minimiser le temps d'élution (Figure 5.9). La méthode est complétée en 15 minutes telle que décrite dans le § 4.5.5.4.

#### 5.4.1.2 Stabilité du pic de la sous-unité HA1

La stabilité du pic de HA1 a été démontrée à l'aide du standard interne 10x cc. Pour ce faire, 5  $\mu$ L du standard 10x cc., préparé pour analyse, ont été injectés consécutivement sur une période de 24 heures post-préparation (hpp). Durant cette période, une diminution graduelle de l'aire sous le pic a été observée. Toutefois, dans les 10 premières heures suivant la préparation de l'échantillon, la diminution de l'aire du pic a présenté un écart-type relatif (ETR) inférieur à 5 % (Table 5.5). Ces résultats démontrent qu'il est possible d'analyser un échantillon au maximum 10 heures après sa préparation sans avoir d'erreur significative sur la valeur de l'aire du pic. Cela signifie que jusqu'à 35 échantillons peuvent être préparés simultanément (considérant le temps d'analyse de 15 min et l'intervalle entre chaque injection) et ensuite injectés à tour de rôle.

Table 5.5: Stabilité du pic de HA1 de la souche A/PR/8/34 après préparation

	5 hpp	10 hpp	24 hpp
Aire du pic	320,01 ± 5,58	307,66 ± 11,60	290,79 ± 33,15
% ETR	1,74	3,77	11,40

### 5.4.1.3 Validation de la méthode de quantification

#### 5.4.1.3.1 Précision

La précision de la méthode a été confirmée par des injections du standard interne 10x cc. de la souche A/PR/8/34 H1N1, à raison de 5 injections journalières consécutives et sur une période de 5 jours. Chaque jour, l'échantillon a été préparé de façon identique (même volumes prélevés, temps d'incubation, etc.). Les valeurs des aires sous le pic (AP) ainsi que les temps de rétention (TR) ont été comparées et analysées afin de déterminer les précisions en intra (répétabilité) et en inter (reproductibilité). Dans les deux cas, les aires et temps ont respectivement présenté des ETR inférieurs à 5 et 2 % (Table 5.6). Une injection de 5 µL du standard interne donne une aire sous le pic de 298,45 ± 12,58 (valeur obtenue pour les 25 injections au total) pour une concentration de 5,08 ± 0,13 log unités HA/mL.

Table 5.6 : Évaluation de la précision de la méthode via la mesure des aires sous le pic et temps de rétention

	Répétabilité	Reproductibilité
Aire sous le pic	298,45 ± 12,17	298,45 ± 5,47
% ETR	4,08	1,83
Temps de rétention	3,96 ± 0,01	3,96 ± 0,01
% ETR	0,22	0,30

Une analyse similaire a aussi été réalisée pour l'échantillon provenant directement du surnageant de culture. Dans ce cas, l'aire sous le pic et le temps de rétention présentaient des écarts-types relatifs également inférieurs à 5 et 2 % respectivement. Ceci démontre la bonne précision de cette méthode, même pour des échantillons non concentrés et purifiés.

#### 5.4.1.3.2 Limites de détection et de quantification, zone de linéarité

Les limites de détection et de quantification pour la souche A/PR/8/34 H1N1 ont été définies à partir du même standard interne 10x cc. ayant servi à l'identification des autres paramètres. Après la préparation classique de l'échantillon, des dilutions sériées (1/2) de ce standard ont été réalisées (jusqu'à la dilution  $\frac{1}{256}$ ). La série de dilutions a ensuite été injectée en duplicata, au départ de la plus grande dilution, à raison de 5  $\mu$ L chacune.

La dilution  $\frac{1}{64}$  de ce standard interne est celle permettant de détecter et d'intégrer le pic de HA1. À cette dilution, la concentration en HA est de  $1,86.10^3$  unités HA/mL (pour 5  $\mu$ L injecté). Cette concentration correspond à la limite de détection (LOD) de la méthode pour la souche A/PR/8/34. La limite de quantification (LOQ) a été définie comme étant la dilution pour laquelle l'écart-type relatif (ETR) est inférieur à 10 %. Cette dilution correspond à  $\frac{1}{32^{\text{ème}}}$  du standard interne, ou encore  $3,71.10^3$  unités HA/mL (ETR de 9,02 % pour 14 injections étalées sur 7 jours).

La courbe standard a ainsi pu être élaborée en utilisant ces données. Pour ce faire, des dilutions sériées du standard 10x cc. ont été successivement injectées en duplicata. Pour déterminer la zone de linéarité de la courbe, des volumes croissants (5, 10, 20, 30 et 40  $\mu$ L) du standard non-dilué ont également été injectés. 7 courbes standards ont ainsi été générées sur 7 jours différents suivant la même procédure. Pour chaque échantillon, les ETR des 14 injections étaient inférieurs à 10 % et à 5 % pour les dilutions  $\frac{1}{32}$  et  $\frac{1}{16}$ .

Les courbes établies suivent la même tendance et aucune ne montre une déviation significative par rapport aux autres (Figure 5.10). Les pentes et les coefficients de détermination des courbes présentent un ETR inférieur à 5 % alors que celle des résidus est de 78 %

Table 5.7). L'augmentation du volume injecté ne semble pas influencer le résultat obtenu pour les concentrations analysées. Dès lors, la limite maximale de quantification dépend essentiellement de la concentration du standard utilisé,  $9,51.10^5$  unités HA/mL. La zone de linéarité est large et couvre plus de 2 log d'unités HA/mL. Toutefois, la concentration classique en unités HA/mL



dans les surnageants de culture se situe généralement aux alentours de  $1.10^4$  unités HA/mL ce qui réduit la zone d'application classique de la courbe à 1 log environ.

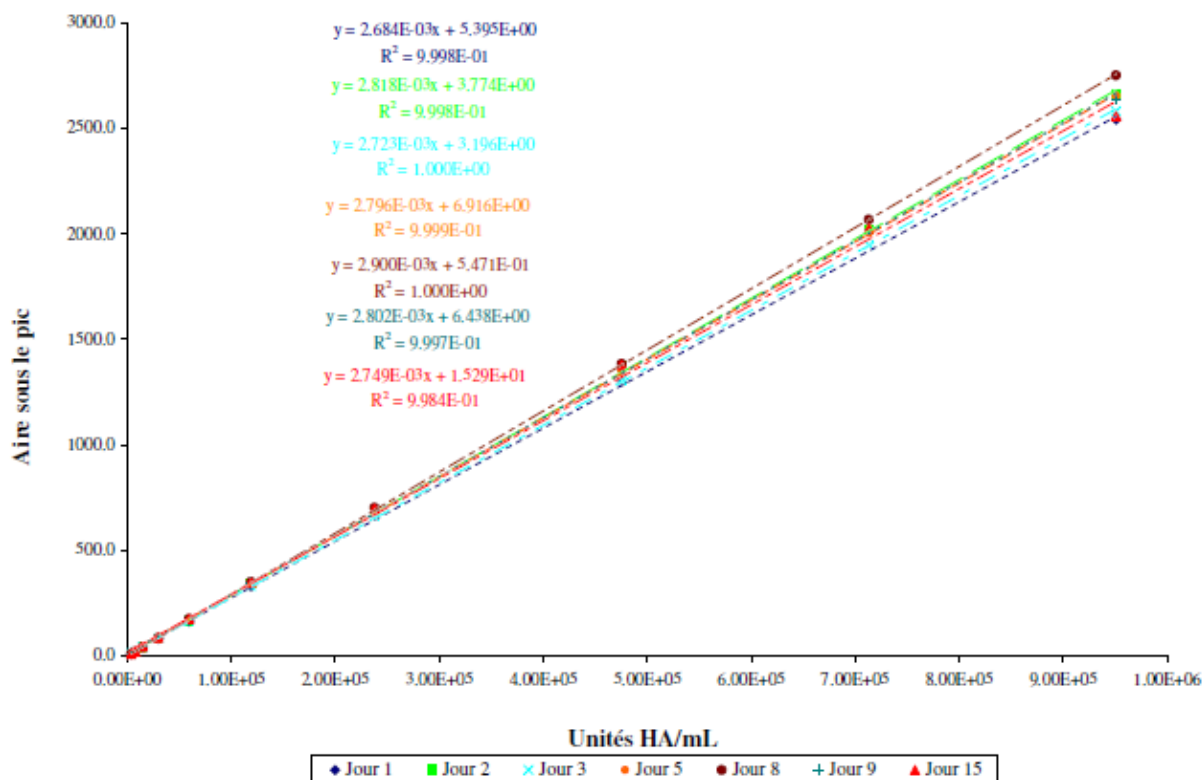


Figure 5.10 : Courbes standards établies sur 7 jours (intervalle de 15 jours) pour la quantification de HA de  $3,71.10^3$  à  $9,51.10^5$  unités HA/mL (ou 3,57 à 5,98 log unités HA/mL).

Table 5.7 : Moyennes, écart-types et écart-types relatifs pour les pentes, résidus et coefficient de détermination des courbes standards.

	Pente	Résidus	Coef. de détermination
Moyenne	$2,78.10^{-3}$	5,94	$9,99.10^{-1}$
Écart-type	$7,07.10^{-5}$	4,66	$5,65.10^{-4}$
% ETR	2,54	78,47	0,06

Bien que régulièrement utilisé en recherche, le test HA n'est pas considéré comme un test de référence par les autorités sanitaires. C'est pourquoi, il semble intéressant d'obtenir une courbe

standard exprimant les quantités de HA en  $\mu\text{g/mL}$ . Cette quantification du standard est rendue possible par SRID (méthode de choix pour quantifier les doses vaccinales en HA). Ce test étant long à mettre en place et fastidieux à opérer, une approche rapide a été faite afin de déterminer le facteur de réponse de la technique pour la souche A/PR/8/34 en fonction de la concentration en HA1 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Cette approche est discutée en Annexe 7 et est comparée à un standard externe quantifié par SRID.

#### **5.4.2 Suivi de production virale dans le surnageant cellulaire par mesure de HA**

L'intérêt de cette méthode de quantification est la possibilité de suivre en temps quasi réel l'évolution de la concentration en unités de HA dans le surnageant de culture, sans devoir faire subir à l'échantillon un traitement autre que celui requis pour l'analyse à proprement parler. Pour valider cette affirmation, un suivi de production du virus A/PR/8/34 dans le milieu HYQ pour deux conditions différentes (MOI de 0,01 et de 1,0) a été réalisé avec un échantillonnage à intervalle régulier sur une période de 68 heures post-infection.

Plusieurs composantes ont été considérées dans cette expérience. D'une part, le choix du contrôle utilisé pour la normalisation du signal. Le tampon Tris ou encore le milieu HYQ possède un profil d'élution qu'il faut soustraire du signal provenant de l'échantillon afin de limiter les erreurs d'intégration. Durant la culture et la prolifération virale, la composition du milieu de culture change. Ces paramètres sont à prendre en compte lors de l'analyse HPLC afin d'être le plus proche possible des conditions du milieu au temps d'échantillonnage et en absence de virus. Une culture contrôle avec trypsine a été menée et échantillonnée en parallèle à la production virale. D'autre part, en guise de comparaison, les titres en HA ont été quantifiés par test HA (une seule analyse effectuée). Cela a également permis d'identifier pour les deux techniques, le temps post-infection à partir duquel il a été possible de mesurer un titre HA dans les échantillons.

Lors de l'analyse des chromatogrammes, il est apparu que le tampon Tris-HCl contenant 1 % de Zwittergent ne peut être considéré comme un blanc. En effet, un certain nombre de molécules du

milieu de culture affecte le signal. Néanmoins, les modifications intervenant dans le milieu de culture au cours de la croissance cellulaire (excluant l'impact de la prolifération virale) n'interfèrent pas sur l'allure du signal de façon significative. De ce fait, le choix du blanc s'est porté sur le milieu de culture contenant de la trypsine et avant addition du virus, permettant ainsi de faciliter les étapes subséquentes de traitement des résultats.

Les titres ont été quantifiés par test HA et par RP-HPLC (courbe standard établie le jour des analyses). Le test HA a été réalisé à une seule reprise alors que les échantillons ont été injectés en duplicata pour la RP-HPLC (50  $\mu$ L). Bien que le nombre de répétitions dans les analyses (surtout dans le test HA soumis à variations selon le stock d'érythrocytes) soient faibles, une première tendance peut être observée dans la Figure 5.11.

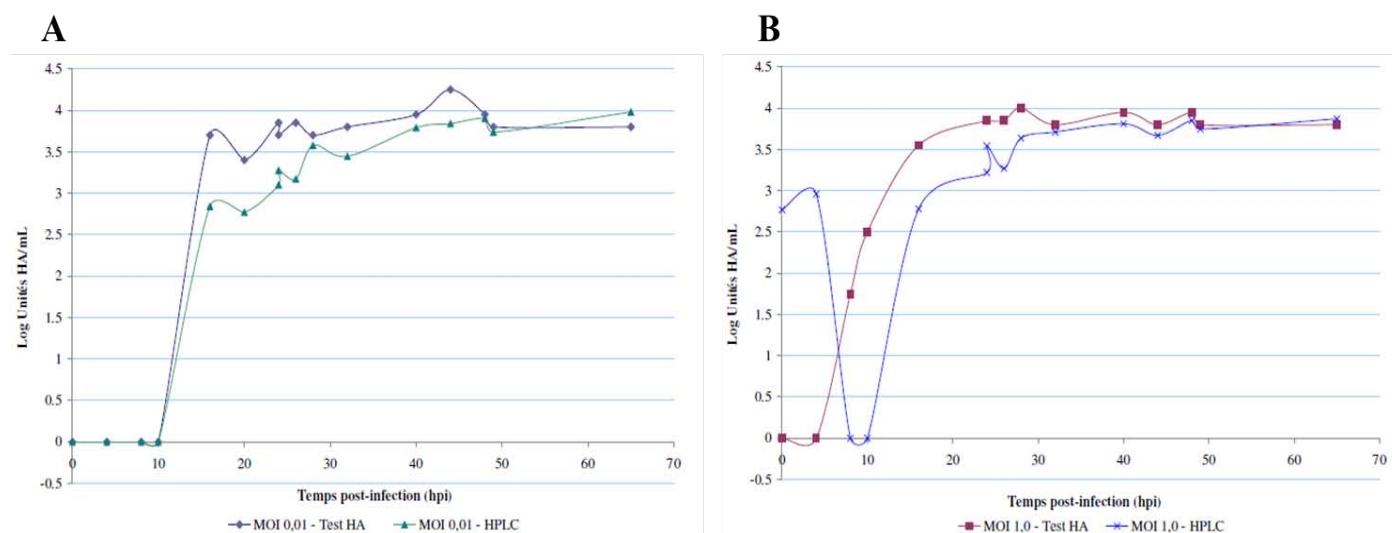


Figure 5.11 : Suivi de production virale par quantification des activités HA (Log unités HA/mL) par RP-HPLC et test HA pour des cultures à MOI de 0,01 (A) et 1,0 (B).

Premièrement, le seuil de détection des deux techniques semble similaire. Malgré un volume d'injection de 10 fois supérieur à la normale (50 vs 5  $\mu$ L), la limite de détection de la méthode HPLC n'a pas pu être diminuée de façon significative. Également, il est intéressant de relever la détection du pic HA1 aux temps 0 et 4 hpi pour la culture à la MOI de 1,0 (Figure 5.11 – B). Ces valeurs sont toutefois à confirmer, car aucune activité n'est remarquée à ces temps de récolte avec le test HA. La présence du pic de HA1 dans cette culture peut se justifier par l'ajout élevé de virus à l'infection (et pas totalement intégré dans les cellules au moment de l'échantillonnage) ou

encore à une interférence élevée découlant de l'intégration des pics (plus le pic est faible plus l'erreur peut être élevée). Cette dernière hypothèse est privilégiée si on considère que le virus ajouté à l'infection ne donnerait pas une activité en HA supérieure à 1,5 log unités HA/mL. De plus, les titres en HA obtenus pour 8 et 10 hpi sont quelques peu contradictoires, car attendus comme nuls.

Par la suite, les titres en HA apparaissent dans les deux méthodes 16 hpi et ce jusqu'à la fin de la culture. De façon générale, les titres sont plus faibles en HPLC que via le test HA. Dans ce dernier, il semble que l'on atteigne rapidement la valeur maximale alors que les titres sont encore faibles et croissants dans l'HPLC.

Sur base de ces premiers résultats, si la méthode par RP-HPLC reste à valider dans le cas des faibles concentrations observées durant les premières heures suivant l'infection, elle s'avère néanmoins fournir des titres en accord avec ceux mesurés par test HA.

### **5.4.3 Spécificité de la méthode de RP-HPLC pour diverses souches d'influenza**

L'intérêt d'une telle méthode de quantification réside dans la possibilité de l'appliquer à d'autres souches sauvages du virus influenza. Comme il a été démontré par d'autres chercheurs ayant travaillé sur cette technique (§ 2.5.4), le temps de rétention et le facteur de réponse (aire sous le pic *vs* concentration en unités HA/mL) du pic de HA1 peuvent différer selon la souche (ces deux paramètres dépendant directement de la composition en acides aminés de la sous-unité). Ces observations ont donc requis confirmation de l'applicabilité de la méthode pour ces souches.

Des souches produites en HEK 293, différant entre-elles par leur origine et donc le type d'hémagglutinine, ont été analysées par cette méthode. Une seconde souche H1N1, A/WS/33, deux souches H3N2, A/Aichi/2/68 et A/Hong Kong/8/68, et la souche B/Lee/40 ont été étudiées. Ces quatre souches ont été préalablement quantifiées par test HA afin de confirmer la présence de la protéine dans ces échantillons.

Lors de l'analyse des surnageants de ces souches, trois pics principaux ont été observés entre 4 et 4,5 min (4,0 min; 4,3 min; 4,5 min), avec un rapport entre ces pics plus ou moins différent selon la souche (Figure 5.12). Comparé à la souche A/PR/8/34, les profils sont similaires et présentent également un faible pic vers 4 min (Figure 5.12 – pic # 1) (pic de HA1 pour la souche standard A/PR/8/34). Se référant aux indications fournies dans la littérature, il aurait pu être attendu que le pic de HA1 des différentes souches élue à un autre moment. Pour confirmer que le pic observé vers 4 min correspond bien à celui de HA1, une étape de changement de tampon/concentration a été réalisée avec une colonne YM-100. Le but de cette étape était de conserver uniquement les particules virales dans le rétentat ; les protéines contaminantes et non-liées au virus devant se retrouver dans le perméat et ainsi ne plus interférer avec le pic de HA1.

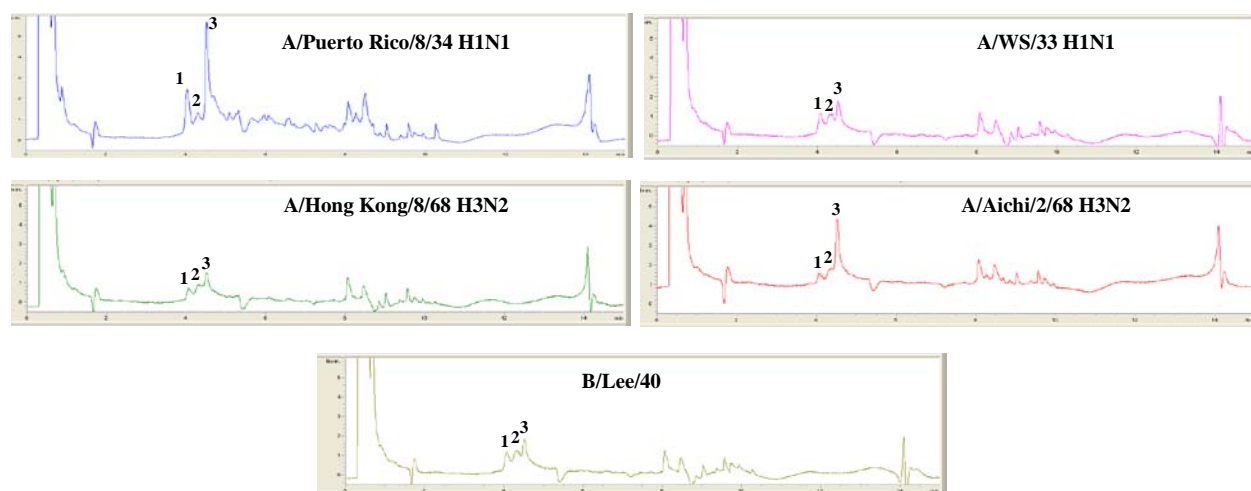


Figure 5.12 : Profils d'élution obtenus à 214 nm pour les surnageants des différentes souches d'influenza (injection de 5  $\mu$ L).

Grâce à cette étape, des différences significatives dans les profils d'élution entre les filtrats et les rétentats ont pu être mises en évidence. En effet, le pic majoritaire apparaissant à 4,5 min (Figure 5.12 – pic # 3) dans les profils des surnageants se retrouve également dans ceux des filtrats (Figure 5.13 – pic # 3). Ceci indique que cette protéine n'est pas reliée au virus. Une injection du milieu de culture HYQ en présence de trypsine et exempt de virus a permis de démontrer que ce pic provient bien du milieu HYQ (résultat non montré).

Lors de l'injection des rétentats concentrés (facteur  $\sim 20\times$ ) des diverses souches, un pic intense a été élué à un temps de rétention similaire ( $\sim 4,05$  min) (Figure 5.13 – pic # 1). Ce pic est également retrouvé dans les filtrats, mais à une intensité très faible par rapport à celle retrouvée dans les rétentats. Ces résultats démontrent que le premier des trois pics observés dans les surnageants de culture est bien le pic de HA1 et que son temps de rétention est identique pour les souches étudiées. Néanmoins, l'aire sous le pic varie d'une souche à l'autre pour une même quantité d'unités HA injectée, ce qui nécessite l'obtention d'un standard spécifique pour la quantification de chaque souche virale.

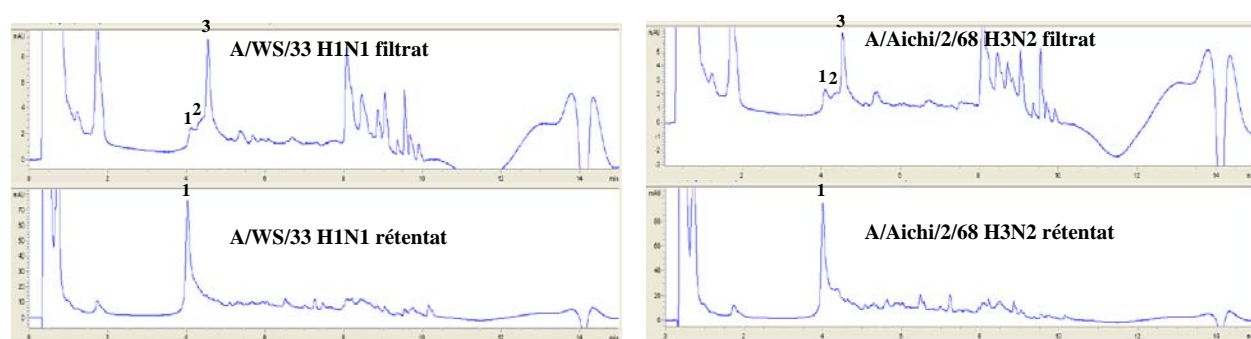


Figure 5.13 : Profils d'élution obtenus à 214 nm pour les perméats et rétentats des souches A/WS/33 H1N1 et A/Aichi/2/68 d'influenza (injection de 25  $\mu$ L).

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Deux objectifs principaux, tous deux reliés directement au développement d'un procédé de production de particules pseudo-virales (VLP) d'influenza, ont été définis pour ce projet de maîtrise.

Tout d'abord, l'emphasis a été placée sur l'évaluation du potentiel de production de ces VLP en cellules d'insectes Sf9, au départ de baculovirus recombinants contenant respectivement les gènes de HA, NA (venant de la souche A/New Caledonia/20/99) et M<sub>1</sub> (dérivé de la souche A/Udorn/307/72). Les paramètres de production ont été testés sur base des informations retrouvées dans la littérature et reprises à la Table 2.1.

Ainsi, au cours des premières séries d'expériences réalisées, il a été démontré que chaque baculovirus était capable de délivrer le gène d'intérêt dans la cellule hôte et d'induire son expression. Suite à une triple infection par ces baculovirus, l'expression simultanée des trois protéines a été partiellement identifiée car bien plus faible que dans les cas des infections simples. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par la plus faible MOI utilisée dans l'essai (3,3 au lieu de 10 pour l'infection simple) ou encore par la possible présence d'une compétition dans l'expression des trois protéines virales. Cette observation corrobore celles effectuées par plusieurs groupes de recherche pour un système d'expression BV/cellules d'insectes similaire [9, 104]. En effet, les taux de production des VLP rapportés à ce jour dans la littérature demeurent faibles et il faut généralement avoir recours à une étape de concentration pour permettre leur détection par WB. Ceci expliquerait donc l'absence de signal pour HA constatée lors de ces premiers travaux.

Lors des expériences menées en vue de l'obtention d'un standard pur en VLP (notamment pour supporter le développement de la méthode de quantification), certaines limitations sont apparues pour le système de production baculovirus (BV) recombinants-cellules d'insectes Sf9. Tout d'abord, une large contamination en BV, liée à de faibles taux de production en VLP, a été observée suite à l'analyse par microscopie électronique d'échantillon pré-purifié. Cette contamination, due au bourgeonnement simultané des BV hors des cellules infectées fut préalablement rapportée par d'autres groupes de recherche [9, 116]. Celle-ci a donc constitué une

contrainte majeure lors des études ayant trait à la production et à la purification des VLP. Malgré diverses tentatives de production en cellules Sf9 avec des rapports en BV différents pour l'infection, les niveaux d'expression de ces particules n'ont jamais été suffisamment élevés pour permettre la détection par WB de HA ou NA dans les surnageants de culture. De nombreuses études retrouvées dans la littérature ayant mis en lumière l'influence de certains paramètres de culture sur les rendements de production [9, 47, 67], des expériences ont été conduites pour évaluer l'impact du temps de récolte, du type de cellule-hôte et de divers rapports entre les trois rBV, sans toutefois permettre d'atteindre des concentrations supérieures en HA ni une diminution de la contamination par les BV.

Une éventuelle agglutination des VLP au niveau des membranes cellulaires, susceptible d'entraîner une importante perte dès les premières étapes de purification, a également été considérée. L'ajout au temps de récolte ou durant la culture d'agents désagrégeants tel que de la neuraminidase n'a cependant apporté aucune amélioration significative pour le relargage des VLP.

Parallèlement à ces essais, l'apparition d'un manque d'infectivité d'un des stocks de BV (rBV-HA), a soulevé un doute sur la capacité de ce BV à délivrer le gène d'intérêt aux cellules hôtes de façon optimale (Annexe 6). L'apparition de HA au niveau de la membrane du baculovirus en lieu et place des gp64 a déjà été discutée [102] et pourrait expliquer cette perte en infectivité au cours des passages. La réduction du nombre de gp64 présentes sur la membrane virale pourrait réduire sensiblement l'entrée du virus dans la cellule hôte et diminuer le caractère infectieux des BV. Toutefois, ce problème ne semble pas se produire pour le rBV-NA, bien que cette protéine soit également transmembranaire, soulignant le besoin d'investigation supplémentaire pour comprendre le mécanisme menant à cette perte d'infectivité.

Le second objectif, toujours lié à la production des VLP et à leur suivi de purification, a constitué en la mise sur pied d'une méthode de quantification par HPLC en phase-inversée. L'intérêt principal de cette méthode est qu'elle permet la détermination de quantités en HA, même à de faibles concentrations, contenues dans les surnageants cellulaires. Considérée comme une mesure hors-ligne mais directe de l'échantillon (car ne requérant aucune étape de prétraitement



particulière), la méthode a tout d'abord été établie à l'aide de virus sauvage de la souche A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (n'ayant pu générer un stock pur et concentré en VLP).

Premièrement, les conditions de préparation et de séparation ont demandé certains ajustements par rapport aux informations obtenues depuis la littérature. Deux types de colonnes, poreuse (pores de 10  $\mu\text{m}$ ) [16, 95] ou non-poreuse (particules de 1,5  $\mu\text{m}$ ) [96, 97] ont présenté des résultats différents. En effet, la colonne poreuse n'a pas permis d'isoler la sous-unité HA1 des autres constituants viraux au contraire de la seconde, non-poreuse. Cette observation peut s'expliquer vraisemblablement par une adsorption non-spécifique importante des composés hydrophobes et semble corroborer celles préalablement décrites par Garcia-Cañas *et al.* [96]. L'utilisation d'une colonne non-poreuse limite ces adsorptions non-spécifiques et facilite l'élution des composés (condition d'élution douce).

Suite à ce choix de colonne, les étapes de préparation de l'échantillon ont été examinées. Ainsi, la désintégration de la membrane lipidique par traitement de l'échantillon par le Zwittergent et le Tween-80 a été comparée. Bien qu'utilisé par Lorbetskie *et al.* [97], le Tween-80 a fourni des pics d'intensités sensiblement inférieures à celles obtenues avec le Zwittergent. Cette perte d'intensité n'a pas pu être clairement expliquée, bien que le type de souche analysée ainsi que son mode de production puissent être impliqués. Également, l'impact de la trypsine et de l'iodoacétamide ont été évalués. Présentée comme indispensable pour le clivage de HA0 en ces deux sous-unités [95], il a été démontré que la trypsine n'augmente pas significativement le signal obtenu [16]. Après confirmation de leur faible impact sur le signal enregistré, les traitements par la trypsine et l'iodoacétamide ont été éliminés.

Consécutivement à ces divers ajustements (type de colonne, préparation de l'échantillon, composition des solvants, profil d'élution), il a été possible de déterminer des conditions permettant d'obtenir un pic stable et précis pour la sous-unité HA1. Une zone de linéarité a également été établie donnant ainsi accès à la détermination de la concentration en HA (unités de HA/mL) dans des échantillons provenant directement de la production cellulaire. De plus, quelques tests préliminaires ont permis de mettre en évidence la validité de la méthode pour le suivi de la production virale dans des cultures de cellules HEK 293 durant 68 heures post-infection, permettant d'observer le début de la relâche virale. Dans ces tests, il n'a pas été

possible de détecter le pic de HA1 dans les premières heures suivant l'infection. Ceci peut s'expliquer soit par un manque de sensibilité de la méthode, soit par une absence de HA dans le milieu de culture. Cette dernière hypothèse semble la plus probable étant donné qu'il a été démontré que le cycle infectieux du virus requière environ 20 heures avant la relâche des premiers virus hors de la cellule [112].

A titre de comparaison, la Table 5.8 reprend les paramètres principaux obtenus pour la technique développée ici et ceux présentés par d'autres groupes de recherche. Afin de faciliter la comparaison, les données identifiées durant ce projet ont été converties en  $\mu\text{g/mL}$  grâce aux travaux préliminaires discutés en Annexe 7.

Table 5.8 : Comparaison des paramètres essentiels de la méthode de quantification selon les groupes de recherches.

Références	Kapteyn <i>et al.</i> [16, 95]	Garcia-Cañas <i>et al.</i> [96] Lorbetskie <i>et al.</i> [97]	Ce travail
Type de colonne	Poreuse	Non-poreuse	Non-poreuse
Système HPLC	Waters Alliance	Waters Alliance	Agilent Series
Détection	214 nm	214 nm - ex280/em335	214 nm
Type d'échantillon	Préparations vaccinales pures et concentrées	Préparations vaccinales pures et concentrées	Surnageants et concentrats
Origine	Œufs - PER.C6- MDCK	Œufs	HEK 293
Préparation	Zwit. - Tryp. - DTT/IAA	Tween-80 – DTT	Zwit. – DTT
Souche virale	A/Wyoming/3/2003 (H3N2)	A/Brisbane/59/2007 (H1N1) A/California/7/2009 (H1N1)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)
LOD / LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	8,0 / 8,0	0,25 / 0,75 - 1,0 / 3,0	3,24 / 6,48
Zone de linéarité ( $\mu\text{g/mL}$ )	8 – 62	2,5 – 100	6,48 - 16,6

Dans cette Table 5.8, il est intéressant de distinguer les variations intervenant entre les groupes de recherche. Ainsi, dans les trois techniques, ni le système HPLC ni les types de colonne et de détection utilisés ne sont équivalents. De plus, l'origine des souches virales analysées se distingue fortement. Dans les recherches antérieures, des doses vaccinales, le plus souvent inactivées, ont été testées alors que dans le cas présent, ce sont des virus actifs non-purifiés qui

ont servi d'échantillons et de standard. Les contraintes rencontrées lors de l'analyse, incluant l'impact de l'inactivation ou du milieu de culture sur l'analyse, ne sont bien évidemment pas les mêmes.

Enfin, le type de souche utilisée comme standard pour l'établissement de la courbe de quantification affecte directement les paramètres tels que les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ), ainsi que la zone de linéarité. En effet, la composition en acides aminés de la sous-unité HA1 semble influencer le facteur de réponse et le temps de rétention obtenus pour celle-ci. Comme décrit dans le § 5.4.3 ainsi que par les autres groupes, l'aire sous le pic est variable d'une souche à l'autre pour une même quantité d'HA injectée. Cette variation peut s'expliquer par la présence d'acides aminés absorbant plus ou moins à 214 nm. Dès lors, le facteur de réponse de HA1 est directement lié à la composition en AA (laquelle est variable selon la souche analysée). Le système de production utilisé ainsi que la différence de point isoélectrique pourraient également affecter le temps de rétention par la présence plus ou moins abondante de glycosylation et de charges différentes. Néanmoins, il se peut que certaines souches présentent des temps de rétention quasi identiques, comme celles étudiées par Lorbetskie *et al.* (A/New Caledonia/20/99 H1N1 et A/Uruguay/716/07 H3N2). Les temps de rétention similaires observés dans le § 5.4.3 pour les différentes souches virales produites en HEK 293 semblent donc être valides.

Bien qu'elle n'ait pas pu être appliquée aux VLP dans le cadre de cette maîtrise en raison des faibles rendements de production, les résultats regroupés ouvrent néanmoins la voie vers l'utilisation de façon routinière de cette méthode de quantification pour l'hémagglutinine d'influenza. La méthode pourra ainsi faciliter le développement de la plateforme VLP, mais aussi toute autre forme de plateforme pour le virus influenza en général.

## CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au terme de ce projet, il apparaît clair qu'un certain nombre de points restent à approfondir ou à développer entièrement. Néanmoins, l'identification et la compréhension des contraintes du système à l'étude s'avèrent une étape essentielle pour permettre d'orienter les travaux futurs. Dans le cadre de ces travaux, les contraintes majeures se sont principalement situées au niveau de la génération des particules pseudo-virales. Malgré un nombre répété de tentatives (utilisant à chaque fois des paramètres de culture et d'infection différents), il n'a pas été possible de générer un stock pur et concentré de VLP. Bien que les images de microscopie électronique aient présenté des particules à la morphologie proche de celle du virus sauvage, la contamination prédominante causée par les baculovirus n'a pas permis d'isoler ces VLP du reste du surnageant cellulaire.

Au vu de ces expériences, une série de perspectives reste envisageable pour la génération des VLP en cellules d'insectes ou encore de mammifères. Pour ce faire, la construction de nouveaux stocks de baculovirus recombinants (rBV) exprimant HA, NA et M<sub>1</sub> semble être indispensable pour pallier au manque d'infectivité des premiers stocks utilisés dans ces expériences (Annexe 6). La production par triple infection ne garantit toutefois pas l'expression simultanée des trois gènes dans une même cellule hôte. Pour augmenter les chances d'obtenir une expression des trois protéines et ainsi former des VLP, la création d'un baculovirus recombinant incluant ces trois protéines, comme suggérée par Pushko *et al.* [65], pourrait être pertinente. Dans ce cas, s'il y a entrée de ce baculovirus dans la cellule hôte, cela augmente les chances de voir les 3 gènes viraux être exprimés simultanément. Néanmoins, ce type de construction est peu flexible et ne permet aucune modulation des rapports entre les trois protéines. Or, ces rapports pourraient potentiellement être importants pour le relargage optimal du virus (plus de protéines M<sub>1</sub> pour faciliter le bourgeonnement ?). L'apport d'une quatrième protéine virale, M<sub>2</sub>, pourrait également être considéré. Comme discuté en introduction, le rôle des protéines M dans le processus d'assemblage et de bourgeonnement du virus n'est pas encore clairement défini et laisse donc la place à différentes approches. Pour finir, le choix de la souche virale utilisée pour la production des VLP pourrait être reconsidéré, ayant maintenant à disposition une technique de quantification basée sur la souche A/PR/8/34 et dont les paramètres ainsi que le standard interne sont maîtrisés.

S'il doit demeurer le système de production de choix, il apparaît important de limiter au maximum la compétition entre les deux mécanismes de bourgeonnement dans les cellules d'insectes. Ceci pourrait se faire par l'utilisation de baculovirus infectieux, mais déficient en un gène permettant leur bourgeonnement. Néanmoins, ce principe est encore très exploratoire et tant la stabilité des constructions que l'établissement de hauts taux de production restent à démontrer [117].

Une autre alternative pouvant être envisagée et permettant de réduire sensiblement la contamination en baculovirus, est l'utilisation du système d'expression BV recombinants-cellules de mammifères. Bien qu'elles tolèrent moins bien les contraintes liées aux conditions de culture que celles d'insectes, les cultures en cellules de mammifères permettent l'entrée des BV et l'expression par un promoteur adapté (e.g. CMV) des gènes recombinants qu'ils transportent. Également, elles génèrent des protéines possédant des glycosylations plus proches de celles que l'on peut retrouver *in vivo*. Récemment, Tang *et al.* [69] a décrit un système de production de VLP de la souche A/Puerto Rico/8/34 par l'utilisation d'un baculovirus recombinant exprimant les protéines HA, NA et M<sub>1</sub> dans une culture de cellules 293 T, laissant entrevoir de nouvelles stratégies de production. L'utilisation des cellules de mammifères demeurent donc une alternative à une contamination par les BV. Une fois de nouvelles constructions en BV disponibles, de nouvelles expériences, incluant l'analyse de paramètres et le remplacement du milieu de culture suite à la transduction afin d'éliminer les BV résiduels, pourraient être entreprises.

Enfin, le dernier système possible pour la production des VLP est celui utilisant des plasmides en présence de cellules de mammifères. Dans ce cas, aucune contamination par les BV n'est possible. Néanmoins, le rapport entre l'ADN et le polyplexe doit être également défini afin d'avoir une production des plus optimales avec les plasmides disponibles.

Dans tous les cas de production précités, quel que soit le système utilisé, il a déjà été démontré que les rendements de production virales pouvaient être optimisés par une infection/transduction à haute densité cellulaire et/ou par la mise en place d'un mode en fed-batch [118] ou en perfusion [112]. Ceci présuppose toutefois que des études métaboliques soient conduites, notamment pour identifier les besoins nutritionnels spécifiques des cellules et les conditions de culture permettant de les maintenir dans un état physiologique propice à la production.

En ce qui concerne la partie quantification, l'adaptation de la technique de quantification de l'hémagglutinine du virus influenza par HPLC en phase inversée permet d'entrevoir d'intéressantes perspectives de développement du procédé de production, tant pour le virus sauvage que pour les particules pseudo-virales. Malgré l'absence de quantités suffisantes en VLP, la mise en place de la méthode au départ du virus sauvage de la souche A/PR/8/34 H1N1 et l'identification des paramètres propres de la technique (conditions d'opérations, préparation d'échantillon, choix de colonne et phases mobiles, etc.) a pu être réalisée. L'établissement d'une courbe standard basée sur la mesure de l'aire sous le pic en fonction de la concentration en unités HA/mL a complété la méthode et a permis l'analyse préliminaire de production virale dans des surnageants de cultures.

Bien évidemment, une série d'améliorations et d'analyses complémentaires sont requises pour aboutir à une méthode plus robuste et plus rapide. Ces améliorations sont reliées, entre autre, au type de matériel de départ à analyser. Dans le cas du virus sauvage, l'analyse d'autres souches virales, couramment retrouvées dans les formulations de vaccin, serait une étape supplémentaire vers la validation de la méthode pour un nombre étendu de souches. Cela permettrait également d'évaluer plus largement les variations du pic d'HA1 (temps de rétention, facteur de réponse) dépendamment de l'origine du virus, de son mode de production (œufs *vs* cellules) et du type d'inactivation (chimique *vs* UV).

Les souches H1N1 A/Solomon Islands/03/2006, A/New Caledonia/20/1999 et A/Brisbane/59/2007, H3N2 A/Wyoming/03/2003 et B/Florida/04/2006, couramment retrouvées dans les doses vaccinales, devraient ainsi faire partie de ces tests. L'établissement d'une courbe standard propre à chaque souche et au départ d'un standard spécifique hautement purifié et caractérisé semble indispensable pour la quantification de chacune de ces souches étant donné les différences de signal obtenues selon la souche analysée. Il serait également intéressant d'analyser l'impact des variations antigéniques des souches virales sur le signal obtenu par HPLC.

L'amélioration des techniques utilisées pour la production de vaccins à base de VLP pourrait se faire grâce à l'utilisation de la RP-HPLC. En effet, la méthode devrait aider à mettre en évidence les conditions optimales de production. La mesure de titre en HA1 dans les surnageants devrait donner une indication plus précise sur les rendements de production que le Western-Blot. Ainsi,

selon les attentes, une production pourrait être jugée comme satisfaisante lorsqu'une quantité suffisante de HA est détectable directement depuis le surnageant. Par la suite, il serait possible de suivre les rendements et efficacités des différentes étapes de purification. L'établissement d'un standard hautement caractérisé et quantifié par SRID permettrait également d'effectuer des comparaisons directes entre les productions et les quantités requises pour l'obtention d'une dose vaccinale, sans devoir passer le test HA.

Enfin, n'oublions pas que l'établissement d'une technique de quantification des particules totales, tant pour les VLP que pour les virus sauvages, devrait être un des outils les plus puissants pour le développement des modes de production en culture cellulaire du virus influenza, tout comme celles développées pour les baculovirus [108] et les réovirus [119]. Cela permettrait de comparer plus rapidement les conditions et rendements de production ainsi que l'efficacité des étapes de purification.

## RÉFÉRENCES

- [1] R. A. Lamb and R. M. Krug, "Orthomyxoviridae: the viruses and their replication.," in *Fundamental Virology*, P. Lippincott Williams & Wilkins, PA., Ed., Knipe, D. M., Howley, P. M. ed, 2001.
- [2] B. Kalbfuss, *et al.*, "Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines," *Biotechnol Bioeng*, vol. 97, pp. 73-85, May 1 2007.
- [3] WHO. (2003). *Influenza (Fact sheet N°211)*. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/print.html>
- [4] M. Michaelis, *et al.*, "Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door," *Med Microbiol Immunol*, vol. 198, pp. 175-83, Aug 2009.
- [5] J. Cohen, "swine Flu outbreak: Out of Mexico ? Scientists ponder swine Flu's origins.," *Science*, vol. 324, pp. 700-702, 2009.
- [6] J. T. Matthews. (2006) Egg-Based Production of Influenza Vaccine: 30 Years of Commercial Experience. *The bridge - National Academy of Engineering*. 17-24.
- [7] M. W. Wolff and U. Reichl, "Downstream processing: from egg to cell culture-derived influenza virus particles.," *Chem Eng Technol*, vol. 31, pp. 846-857, March, 3, 2008 2008.
- [8] C. Gerdil, "The annual production cycle for influenza vaccine," *Vaccine*, vol. 21, pp. 1776-9, May 1 2003.
- [9] F. Krammer, *et al.*, "Trichoplusia ni cells (High Five(TM)) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines," *Mol Biotechnol*, Mar 19 2010.
- [10] Y. Genzel and U. Reichl, "Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines," *Expert Rev Vaccines*, vol. 8, pp. 1681-92, Dec 2009.
- [11] L. A. Perrone, *et al.*, "Intranasal vaccination with 1918 influenza virus-like particles protects mice and ferrets from lethal 1918 and H5N1 influenza virus challenge," *J Virol*, vol. 83, pp. 5726-34, Jun 2009.
- [12] M. A. D'Aoust, *et al.*, "Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice," *Plant Biotechnol J*, vol. 6, pp. 930-40, Dec 2008.
- [13] A. Le Ru, *et al.*, "Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing," *Vaccine*, vol. 28, pp. 3661-71, May 7 2010.
- [14] Y. Asahi-Ozaki, *et al.*, "Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection," *Microbes Infect*, vol. 8, pp. 2706-14, Oct 2006.
- [15] T. Ali, *et al.*, "Detection of influenza antigen with rapid antibody-based tests after intranasal influenza vaccination (FluMist)," *Clin Infect Dis*, vol. 38, pp. 760-2, Mar 1 2004.



- [16] J. C. Kapteyn, *et al.*, "HPLC-based quantification of haemagglutinin in the production of egg- and MDCK cell-derived influenza virus seasonal and pandemic vaccines," *Vaccine*, vol. 27, pp. 1468-77, Feb 25 2009.
- [17] C. E. Nilsson, *et al.*, "A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance," *Vaccine*, vol. 28, pp. 759-66, Jan 8 2010.
- [18] D. Wang, *et al.*, "The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles," *J Virol*, vol. 84, pp. 4673-81, May 2010.
- [19] K. Subbarao and T. Joseph, "Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses," *Nat Rev Immunol*, vol. 7, pp. 267-78, Apr 2007.
- [20] H. Yu, *et al.*, "Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 386, pp. 278-83, Aug 21 2009.
- [21] R. J. Garten, *et al.*, "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans," *Science*, vol. 325, pp. 197-201, Jul 10 2009.
- [22] R. A. e. a. Lamb, "Genes and proteins of the influenza viruses," in *The influenza viruses*, R. M. Krug, Ed., New-York: Plenum Press, 1989.
- [23] S. M. Carroll and J. C. Paulson, "Differential infection of receptor-modified host cells by receptor-specific influenza viruses," *Virus Res*, vol. 3, pp. 165-79, Sep 1985.
- [24] C. Rohm, *et al.*, "Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes," *Virology*, vol. 217, pp. 508-16, Mar 15 1996.
- [25] R. A. Fouchier, *et al.*, "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls," *J Virol*, vol. 79, pp. 2814-22, Mar 2005.
- [26] Y. Kawaoka, *et al.*, "Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus," *Virology*, vol. 179, pp. 759-67, Dec 1990.
- [27] T. M. Fu, *et al.*, "Comparative immunogenicity evaluations of influenza A virus M2 peptide as recombinant virus like particle or conjugate vaccines in mice and monkeys," *Vaccine*, vol. 27, pp. 1440-7, Feb 25 2009.
- [28] J. M. Galarza, *et al.*, "Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge," *Viral Immunol*, vol. 18, pp. 365-72, 2005.
- [29] B. E. Johansson and I. C. Brett, "Changing perspective on immunization against influenza," *Vaccine*, vol. 25, pp. 3062-5, Apr 20 2007.
- [30] D. Matassov, *et al.*, "A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1)," *Viral Immunol*, vol. 20, pp. 441-52, Sep 2007.
- [31] M. J. Sylte and D. L. Suarez, "Influenza neuraminidase as a vaccine antigen," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 333, pp. 227-41, 2009.

- [32] F. Krammer, *et al.*, "Swine-origin pandemic H1N1 influenza virus-like particles produced in insect cells induce hemagglutination inhibiting antibodies in BALB/c mice," *Biotechnol J*, vol. 5, pp. 17-23, Jan 2010.
- [33] P. Gomez-Puertas, *et al.*, "Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding," *J Virol*, vol. 74, pp. 11538-47, Dec 2000.
- [34] T. Latham and J. M. Galarza, "Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins," *J Virol*, vol. 75, pp. 6154-65, Jul 2001.
- [35] B. J. Chen, *et al.*, "The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding," *J Virol*, vol. 82, pp. 10059-70, Oct 2008.
- [36] L. Simonsen, *et al.*, "Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution," *J Infect Dis*, vol. 178, pp. 53-60, Jul 1998.
- [37] A. Huckriede, *et al.*, "The virosome concept for influenza vaccines," *Vaccine*, vol. 23 Suppl 1, pp. S26-38, Jul 8 2005.
- [38] T. Stegmann, *et al.*, "Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching," *Biochim Biophys Acta*, vol. 904, pp. 165-70, Nov 2 1987.
- [39] T. S. Huang, *et al.*, "Determination of influenza virus proteins required for genome replication," *J Virol*, vol. 64, pp. 5669-73, Nov 1990.
- [40] A. Ali, *et al.*, "Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein," *J Virol*, vol. 74, pp. 8709-19, Sep 2000.
- [41] G. Behrens and M. Stoll, "Pathogenesis and Immunology," in *Influenza Report 2006 - A medical textbook*, B. S. Kamps, *et al.*, Eds., Paris: Flying publisher, 2006, pp. 92-109.
- [42] R. J. Cox, *et al.*, "Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines," *Scand J Immunol*, vol. 59, pp. 1-15, Jan 2004.
- [43] G. Muhamed, *et al.*, "Neuraminidase antibody response to inactivated influenza virus vaccine following intranasal and intramuscular vaccination," *Isr Med Assoc J*, vol. 8, pp. 155-8, Mar 2006.
- [44] P. Pushko, *et al.*, "Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice," *Vaccine*, vol. 23, pp. 5751-9, Dec 30 2005.
- [45] R. Baxter, *et al.*, "Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok(R) trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age," *Vaccine*, vol. 29, pp. 2272-8, Mar 9 2011.
- [46] J. Treanor, "Influenza virus " in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed.*, G. L. Mandell, *et al.*, Eds., Churchill Livingstone, 2004, pp. 2060-2085.

- [47] F. S. Quan, *et al.*, "Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus," *J Virol*, vol. 81, pp. 3514-24, Apr 2007.
- [48] N. Bardiya and J. H. Bae, "Influenza vaccines: recent advances in production technologies," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 67, pp. 299-305, May 2005.
- [49] J. R. Haynes, "Influenza virus-like particle vaccines," *Expert Rev Vaccines*, vol. 8, pp. 435-45, Apr 2009.
- [50] E. de Wit, *et al.*, "Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments," *Virus Res*, vol. 103, pp. 155-61, Jul 2004.
- [51] M. M. Cox, *et al.*, "FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine," *Influenza Other Respi Viruses*, vol. 2, pp. 211-9, Nov 2008.
- [52] R. Brands, *et al.*, "Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine," *Dev Biol Stand*, vol. 98, pp. 93-100; discussion 111, 1999.
- [53] O. Kistner, *et al.*, "A novel mammalian cell (Vero) derived influenza virus vaccine: development, characterization and industrial scale production," *Wien Klin Wochenschr*, vol. 111, pp. 207-14, Mar 12 1999.
- [54] B. J. Chen, *et al.*, "Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles," *J Virol*, vol. 81, pp. 7111-23, Jul 2007.
- [55] R. Noad and P. Roy, "Virus-like particles as immunogens," *Trends Microbiol*, vol. 11, pp. 438-44, Sep 2003.
- [56] C. Y. Wu, *et al.*, "Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus," *PLoS One*, vol. 5, p. e9784, 2010.
- [57] G. Sailaja, *et al.*, "Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells," *Virology*, vol. 362, pp. 331-41, Jun 5 2007.
- [58] L. Buonaguro, *et al.*, "Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses," *J Virol*, vol. 80, pp. 9134-43, Sep 2006.
- [59] D. M. Da Silva, *et al.*, "Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells," *Int Immunol*, vol. 13, pp. 633-41, May 2001.
- [60] P. Lenz, *et al.*, "Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells," *Clin Immunol*, vol. 106, pp. 231-7, Mar 2003.
- [61] R. A. Bright, *et al.*, "Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin," *Vaccine*, vol. 25, pp. 3871-8, May 10 2007.
- [62] S. M. Kang, *et al.*, "Influenza vaccines based on virus-like particles," *Virus Res*, vol. 143, pp. 140-6, Aug 2009.
- [63] D. P. Nayak, *et al.*, "Assembly and budding of influenza virus," *Virus Res*, vol. 106, pp. 147-65, Dec 2004.

- [64] J. R. Haynes, *et al.*, "Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge," *Vaccine*, vol. 27, pp. 530-41, Jan 22 2009.
- [65] P. Pushko, *et al.*, "Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus," *Vaccine*, vol. 28, pp. 4771-4776, 2010.
- [66] X. Jiang, *et al.*, "Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein," *J Virol*, vol. 66, pp. 6527-32, Nov 1992.
- [67] B. Z. Wang, *et al.*, "Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses," *J Virol*, vol. 82, pp. 11813-23, Dec 2008.
- [68] F. Krammer and R. Grabherr, "Alternative influenza vaccines made by insect cells," *Trends in Molecular Medicine*, vol. In Press, Corrected Proof, 2010.
- [69] X. C. Tang, *et al.*, "Baculovirus-produced influenza virus-like particles in mammalian cells protect mice from lethal influenza challenge," *Viral Immunol*, vol. 24, pp. 311-9, Aug 2011.
- [70] J. S. Rossman and R. A. Lamb, "Influenza virus assembly and budding," *Virology*, vol. In Press, Corrected Proof, 2011.
- [71] J. Szecsi, *et al.*, "Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses," *Virol J*, vol. 3, p. 70, 2006.
- [72] N. Landry, *et al.*, "Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza," *PLoS One*, vol. 5, p. e15559, 2010.
- [73] A. Shanley. (2009, 1/27). *Novavax's Robinson; Taking vaccines to the world*. Available: <http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2009/171.html?page=print>
- [74] S. Pincus. (2010, March, 4, 2011). Release and stability testing programs for a novel virus-like particle vaccine. *The Evolution of Vaccines* [Article]. 9. Available: <http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=690799&pageID=1&sk=&date=>
- [75] T. C. Pomfret, *et al.*, "Quadrivalent human papillomavirus (HPV) vaccine: a review of safety, efficacy, and pharmacoeconomics," *J Clin Pharm Ther*, vol. 36, pp. 1-9, Feb 2011.
- [76] FDA. (2009, 02, 28th). *Cervarix, human papillomavirus bivalent (type 16 and 18) vaccine*. Available: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm186957.htm>
- [77] C. E. Greer, *et al.*, "Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts," *J Clin Microbiol*, vol. 33, pp. 2058-63, Aug 1995.
- [78] J. M. Wood, *et al.*, "An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines," *J Biol Stand*, vol. 5, pp. 237-47, 1977.

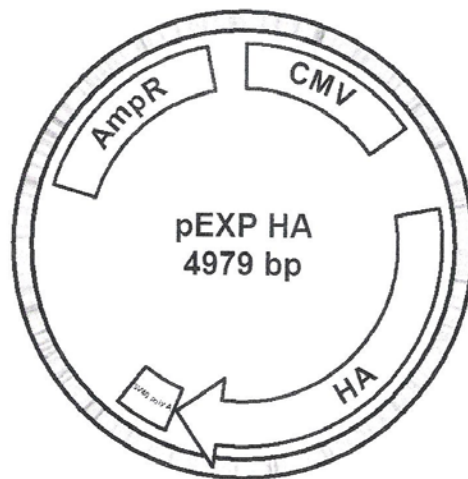
- [79] J. M. Wood, *et al.*, "The influence of the host cell on standardisation of influenza vaccine potency," *Dev Biol Stand*, vol. 98, pp. 183-8; discussion 197, 1999.
- [80] X. Li, Cyr, T.D., *et al.*, "Advances in quantitative analyses of the hemagglutinin of influenza A viruses and vaccines.," in *Global View of Fight against Influenza*, P. M. Mitrasinovic, Ed., 2009, p. 12.
- [81] G. K. Hirst, "The Quantitative Determination of Influenza Virus and Antibodies by Means of Red Cell Agglutination," *J Exp Med*, vol. 75, pp. 49-64, Jan 1 1942.
- [82] J. Salk, "A Simplified Procedure for Titrating Hemagglutinating Capacity of Influenza-Virus and the Corresponding Antibody," *J Immunol*, vol. 49, pp. 87-98, August 1, 1944.
- [83] WHO, "WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance - WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1." Geneva, 2002, pp. 1-99.
- [84] J. C. Hierholzer and R. A. Killington, "2 - Virus isolation and quantitation," in *Virology Methods Manual*, W. J. M. Brian and O. K. Hillar, Eds., London: Academic Press, 1996, pp. 25-46.
- [85] B. Kalbfuss, *et al.*, "Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography," *Biotechnol Bioeng*, vol. 96, pp. 932-44, Apr 1 2007.
- [86] F. Barbe, *et al.*, "Performance of a commercial Swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses," *J Vet Diagn Invest*, vol. 21, pp. 88-96, Jan 2009.
- [87] S. Chang, *et al.*, "A novel vaccine adjuvant for recombinant flu antigens," *Biologicals*, vol. 37, pp. 141-7, Jun 2009.
- [88] R. Wu, *et al.*, "Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against avian influenza virus," *Vet Res Commun*, vol. 31, pp. 631-41, Jul 2007.
- [89] H. L. Robinson, *et al.*, "Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA," *Vaccine*, vol. 11, pp. 957-60, 1993.
- [90] I. G. Barr, *et al.*, "The rapid identification of human influenza neuraminidase N1 and N2 subtypes by ELISA," *Vaccine*, vol. 24, pp. 6675-8, Nov 10 2006.
- [91] I. Legastelois, *et al.*, "Avian glycan-specific IgM monoclonal antibodies for the detection and quantitation of type A and B haemagglutinins in egg-derived influenza vaccines," *J Virol Methods*, vol. 178, pp. 129-36, Dec 2011.
- [92] S. Chun, *et al.*, "Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins," *Vaccine*, vol. 26, pp. 6068-76, Nov 11 2008.
- [93] D. Talmi-Frank, *et al.*, "Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis," *Clin Vaccine Immunol*, vol. 13, pp. 271-6, Feb 2006.

- [94] H. Ishizashi, *et al.*, "Quantitative Western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome," *Thromb Res*, vol. 120, pp. 381-6, 2007.
- [95] J. C. Kapteyn, *et al.*, "Haemagglutinin quantification and identification of influenza A&B strains propagated in PER.C6 cells: a novel RP-HPLC method," *Vaccine*, vol. 24, pp. 3137-44, Apr 12 2006.
- [96] V. Garcia-Canas, *et al.*, "Rapid and selective characterization of influenza virus constituents in monovalent and multivalent preparations using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography columns," *J Chromatogr A*, vol. 1123, pp. 225-32, Aug 11 2006.
- [97] B. Lorbetskie, *et al.*, "Optimization and qualification of a quantitative reversed-phase HPLC method for hemagglutinin in influenza preparations and its comparative evaluation with biochemical assays," *Vaccine*, vol. 29, pp. 3377-89, Apr 18 2011.
- [98] C. F. Mandenius, *et al.*, "Monitoring of influenza virus hemagglutinin in process samples using weak affinity ligands and surface plasmon resonance," *Anal Chim Acta*, vol. 623, pp. 66-75, Aug 8 2008.
- [99] M. F. Diouani, *et al.*, "Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, pp. 580-583, 2008.
- [100] M. Takeda, *et al.*, "Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 14610-7, Dec 9 2003.
- [101] S. X. Zhang, *et al.*, "Palmitoylation of the Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus envelope glycoprotein GP64: mapping, functional studies, and lipid rafts," *J Virol*, vol. 77, pp. 6265-73, Jun 2003.
- [102] D. G. Yang, *et al.*, "Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential," *Mol Ther*, vol. 15, pp. 989-96, May 2007.
- [103] F. He, *et al.*, "Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines," *Expert Rev Vaccines*, vol. 8, pp. 455-67, Apr 2009.
- [104] F. S. Quan, *et al.*, "A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs," *Vaccine*, vol. 26, pp. 3352-61, Jun 19 2008.
- [105] F. S. Quan, *et al.*, "Kinetics of immune responses to influenza virus-like particles and dose-dependence of protection with a single vaccination," *J Virol*, vol. 83, pp. 4489-97, May 2009.
- [106] M. Pearton, *et al.*, "Influenza virus-like particles coated onto microneedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin," *Vaccine*, vol. 28, pp. 6104-13, Aug 23 2010.
- [107] C. F. Shen, *et al.*, "Quantitation of baculovirus particles by flow cytometry," *J Virol Methods*, vol. 105, pp. 321-30, Sep 2002.
- [108] J. Transfiguracion, *et al.*, "Development and validation of a HPLC method for the quantification of baculovirus particles," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 879, pp. 61-8, Jan 1 2011.

- [109] R. Hopkins and D. Esposito, "A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line," *Biotechniques*, vol. 47, pp. 785-8, Sep 2009.
- [110] J. J. Bozzola, "Electron Microscopy," in *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [111] J. R. Harris, "Principles and techniques of electron microscopy biological applications: M. A. Hayat, Fourth Edition (2000), Cambridge University Press, Cambridge, UK. Hardback, 543 pp (101 halftones, 64 line diagrams, 33 tables) ISBN 0-521-63287-0, US\$ 100.00," *Micron*, vol. 33, pp. 325-326, 2002.
- [112] E. Petiot, *et al.*, "Metabolic and kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture," *BMC Biotechnol*, vol. 11, p. 84, 2011.
- [113] F. Krammer, *et al.*, "Influenza virus-like particles as an antigen-carrier platform for the ESAT-6 epitope of Mycobacterium tuberculosis," *J Virol Methods*, Mar 19 2010.
- [114] G. Winter, *et al.*, "Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype," *Nature*, vol. 292, pp. 72-5, Jul 2 1981.
- [115] A. J. Caton, *et al.*, "The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype)," *Cell*, vol. 31, pp. 417-27, Dec 1982.
- [116] S. Pincus, *et al.* (2010, Release and stability testing programs for a novel virus-like particle vaccine. *The evolution of vaccines*, 26-34.
- [117] R. Efrose, *et al.*, "Baculoviruses deficient in ie1 gene function abrogate viral gene expression in transduced mammalian cells," *Virology*, vol. 406, pp. 293-301, Oct 25 2010.
- [118] J. Meghrou, *et al.*, "Development of a simple and high-yielding fed-batch process for the production of influenza vaccines," *Vaccine*, vol. 28, pp. 309-16, Dec 11 2009.
- [119] P. S. Chahal, *et al.*, "Validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the quantification of Reovirus particles type 3," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 45, pp. 417-21, Nov 5 2007.
- [120] E. Gasteiger, *et al.*, "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server The Proteomics Protocols Handbook," J. M. Walker, Ed.: Humana Press, 2005, pp. 571-607.

## ANNEXE 1 – CARTES GÉNÉTIQUES DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT LES PROTÉINES DU VIRUS INFLUENZA

- Carte génétique du baculovirus recombinant exprimant l'hémagglutinine du virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1)

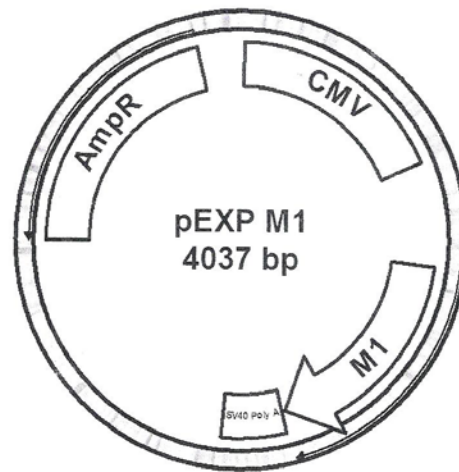


- Carte génétique du baculovirus recombinant exprimant la neuraminidase du virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1)





- Carte génétique du baculovirus recombinant exprimant la protéine M<sub>1</sub> du virus A/Udorn/307/72 (H3N2)



## **ANNEXE 2 – QUANTIFICATION DES PARTICULES TOTALES PAR MARQUAGE AU SYBER GREEN I (HPLC)**

Dans cette annexe, on retrouve les informations spécifiques pour la méthode HPLC menant à la quantification des particules totales de baculovirus décrite dans le § 4.4.2. Les expériences ont été menées sur un système HPLC Waters Alliance 2695 avec un système de chauffage de colonne à 65°C (Applied Biosystems Inc). La colonne échangeuse d'anions est fournie par BioRad (UNO Q Polishing column for continuous bed ion exchange chromatography).

### **Produits**

- Solution stock de Syber Green I 10.000x (Invitrogen – Molecular Probes)
- Tampon 20x Tris-EDTA, pH 7,5 (Invitrogen)
- Tris Ultra Pure (Invitrogen)
- HCl Concentré, 36,46M (Sigma)
- Chlorure de Sodium (EMD)

### **Solvants nécessaires pour l'HPLC**

- Solvant A: 0,1 M Tris-HCl buffer, pH 7,5
- Solvant B: 2M NaCl dans l'eau Milli-Q
- Solvant C: Eau Milli-Q

Après préparation, toutes les solutions doivent être filtrées avec un filtre 0,45  $\mu$ m et dégazées pour un minimum de 10 minutes sous agitation.

### **Méthode**

En fonction de l'origine des baculovirus, une dilution peut être effectuée après marquage au Syber Green I. Toutes les dilutions sont faites dans du tampon Tris-HCl 20 mM au pH 7,5.

Préparer une solution de Syber Green I (SGI) 20 x à partir d'une solution stock 10.000x. La dilution de la solution stock se fait dans un tampon Tris-EDTA 1x (10 mM Tris/1 mM EDTA), pH 7,5.

Ajouter 20 µL de la solution SGI 20x à 1800 L d'échantillon pour obtenir une concentration finale 2x en SGI. Incuber le mélange pendant 1 heure dans le noir avant l'injection à 37°C. Une fois le marquage réalisé, placer les échantillons dans la chambre d'injection de l'HPLC.

Les conditions de séparation pour cette méthode sont les suivantes :

Table annexe 1 : Profil d'élution pour la séparation et quantification des BV par HPLC

<u>Temps (min)</u>	<u>% de solvant A</u>	<u>% de solvant B</u>	<u>% de solvant C</u>
0,0	20,0	16,5	63,5
6,0	20,0	16,5	63,5
8,0	20,0	24,0	56,0
12,0	20,0	24,0	56,0
15,0	20,0	50,0	30,0
18,0	20,0	50,0	30,0
21,0	20,0	16,5	63,5
25,0	20,0	16,5	63,5

La méthode est réalisée avec un débit de 1 mL/min et via une détection par fluorescence à une  $\lambda$  de 479ex/520ém.

## **ANNEXE 3 – TEST D'INFECTIVITÉ DES BACULOVIRUS (TITER LESS)**

Dans cette annexe, on retrouve les informations complémentaires concernant la préparation et l'analyse des résultats obtenus lors du test d'infectivité des baculovirus (§ 4.4.3) en cellules Sf9 exprimant la GFP lorsqu'infectées par les BV.

### **Produits**

- Culture de cellules d'insectes Sf9-ET/GFP [109] (viabilité supérieure à 95% nécessaire) à  $7,5 \cdot 10^4$  cellules/puits
- Milieu SFX (Hyclone: cat # SH30278.02) pour la culture cellulaire, les dilutions de cellules et de virus

### **Méthode**

Ajouter 100  $\mu$ L de milieu de culture (diluant) dans les puits A-H des colonnes 2 à 12. Faire une dilution 1 dans 500 du stock viral (0,1mL de virus dans 50 mL de diluant). Placer 125  $\mu$ L de la dilution virale dans les puits A-H de la colonne 1. Réaliser la dilution sériée 1:5 en transférant 25  $\mu$ L des puits de la colonne 1 dans les puits de la colonne 2. Prélever de nouveau 25  $\mu$ L dans les puits de la colonne 2. Transférer les 25  $\mu$ L dans les puits de la colonne 3. Répéter ces opérations jusqu'à la colonne 11. Les 25 derniers  $\mu$ L de la colonne 11 sont éliminés de façon à ce que tous les puits contiennent 100  $\mu$ L de dilution virale (Figure annexe 1).

Préparer un stock de cellules à une concentration cellulaire de  $7,5 \cdot 10^5$  cellules/mL. Ajouter 100  $\mu$ L de culture cellulaire dans chaque puits. Mettre les plaques dans l'incubateur à 27°C pour cinq jours. Cinq jours après l'infection, lire les plaques sous un microscope à fluorescence.

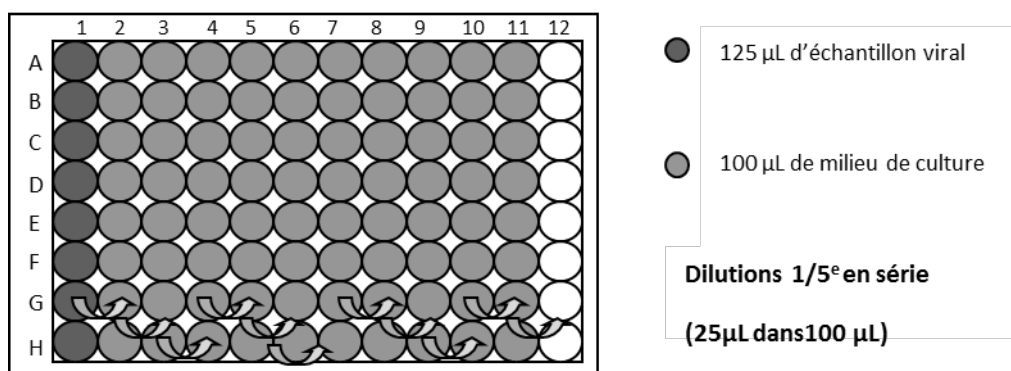


Figure annexe 1: Description des étapes de dilution des BV pour le test Titer Less.

Pour connaître le titre infectieux, chaque colonne (1 à 11) doit être analysée afin d'obtenir le pourcentage de puits contaminés colonne après colonne. La colonne où ce pourcentage est inférieur à 50% sert de repère pour les calculs. Pour plus de compréhension, un exemple est repris ci-dessous dans la Table annexe 2.

Table annexe 2 : Exemple de résultats obtenus pour le test de Titerless. + : puits infectés; - : puits non-infectés.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						+	+	+	-			
B						+	+	-	-			
C						+	-	+	-			
D						+	+	-	-			
E						+	+	+	-			
F						+	-	+	+			
G						+	+	-	-			
H						+	+	-	-			
X8						<u>8</u>	<u>6</u>	<u>4</u>	<u>1</u>			

Au départ des résultats, on peut calculer les puits étant infectés ou non sur toute la plaque comme décrit ici :

$$\text{Titre calculé} = \frac{\text{Pourcentage.au.dessus.de.50.\%} - 50}{\text{Pourcentage.au.dessus.de.50.\%} - \text{Pourcentage.en.dessous.de.50.\%}}$$

$$= \frac{85 - 50}{85 - 45} = 0,875 = \text{distance proportionnée (DP)}.$$

Table annexe 3 : Tableau explicatif pour la détermination du titre infectieux des BV.

	<b>VIRUS DILUTION</b>	<b>NEG. LOG</b>	<b>INFECTED WELLS</b>	<b>NON-INF. WELLS</b>	<b>INFECTED WELLS</b>	<b>NON-INF. WELLS</b>	<b>RATIO</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	1:1000	<b>10<sup>-3</sup></b>						
<b>2</b>	1:5000	<b>10<sup>-3.7</sup></b>						
<b>3</b>	1:25000	<b>10<sup>-4.4</sup></b>						
<b>4</b>	1:125000	<b>10<sup>-5.1</sup></b>						
<b>5</b>	1:625000	<b>10<sup>-5.8</sup></b>						
<b>6</b>	1:3125000	<b>10<sup>-6.5</sup></b>	8	0				
<b>7</b>	1:15625000	<b>10<sup>-7.2</sup></b>	6	2	11	2	11/13	85
<b>8</b>	1:78125000	<b>10<sup>-7.9</sup></b>	4	4	5	6	5/11	45
<b>9</b>	1:390630000	<b>10<sup>-8.6</sup></b>	1	7	1	13		

- DP corrigée = DP x facteur de dilution ( $0,7 = \ln 2$  correspondant à l'écart entre deux dilutions) =  $0,875 \times 0,7 = 0,61$
- Titre viral/ 0,2 mL = DP corrigée + log de la dilution au-dessus de 50% =  $0,61 + 10^{7,2} = 10^{7,81}$
- Titre viral/mL = titre viral pour 0,2 mL x 5 =  $10^{7,81} \times 5 = 3,22 \cdot 10^8$  pfu/mL

## **ANNEXE 4 – ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE SODIUM DODÉCYL SULFATE (SDS-PAGE)**

Cette partie décrit la procédure générale à suivre afin de préparer et réaliser une électrophorèse SDS-PAGE de particules pseudo-virales et d'autres échantillons protéiques (§ 4.5.1).

La SDS-PAGE est la méthode habituellement utilisée pour la séparation des protéines en fonction de leur taille. Elle donne des informations à propos de la pureté et de l'identité des bandes, et peut être suivie par un Western Blot pour une reconnaissance spécifique des protéines.

### **Produits**

- Standard non coloré Precision Plus Protein Broad Range (10 bandes de protéines entre 10 - 250 kDa: cat # 161-0362)
- Dithiothréitol (DTT) (Diagnostic Chemical pureté >99%)
- Tris (Bio-Rad)
- Glycine (Bio-Rad)
- Sodium Dodécyl Sulfate (Bio-Rad)
- HCl concentré, 36,46M (Sigma –Aldrich)
- Glycérol (EMD)
- Bleu de bromophénol, qualité pour électrophorèse (Bio-Rad)
- Kit Silver Stain Plus (Bio-Rad)
- Méthanol (J.T. Baker)
- Acide acétique Ultrapure 100% (EMD)
- Sparkleen 1 (FisherBrand)
- Acide nitrique 70% (EMD)
- Colorant Bio-Safe™ Coomassie G-250 (Bio-Rad)

## Préparation des réactifs pour électrophorèse

Ci-dessous se trouve la liste complète de toutes les solutions nécessaires à la réalisation du SDS-PAGE.

- Tampon de migration (RB) concentré 5x, pH 8,3 (1000 mL)
- Tris HCl 0,5 M, pH 6,8 (100 mL)
- Tampon d'échantillon SDS-PAGE (BIO-RAD concentré – 17,6 mL) avec de l'HCl, 150 mM, pH 6,8, 25 % de glycérol, 6 % de SDS et 0,12 % de bleu de bromophénol. La solution peut être aliquotée en volume de 300  $\mu$ L et congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Sodium Dodécyl Sulfate 20% (SDS) (20 mL)
- Bleu de bromophénol 4% (10 mL)
- Solution de DTT 1,4M dans l'eau (5 mL)
- Acide acétique 5 % dans l'eau Milli-Q (1000 mL)
- Solution Glycérol 5%, acide acétique 10% dans l'eau Milli-Q (1000 mL)
- Solution améliorant la fixation (BIO-RAD) (100 mL). À 30 mL d'eau Milli-Q, ajouter 10 mL d'acide acétique Ultrapure, 10 mL de la solution pour fixation améliorée (enhancer) concentrée, fournie dans le kit et compléter à 100 mL avec 50 mL d'éthanol.
- Solution de coloration et de développement (65 mL). Dans un bécher de 250 mL, ajouter successivement 5 mL des solutions suivantes : complexe d'argent (Silver Complex), modérateur de réduction (Reduction Moderator), et réactif de développement d'image (Image Development Reagent). Préparer séparément 50 mL de la solution accélératrice de développement (Development Accelerator Solution). Lorsque le gel est prêt à être imbibé par la solution, mélanger les deux préparations.
- Solution non colorée pour coloration au bleu de Coomassie (500 mL) À 250 mL d'eau Milli-Q, ajouter 150 mL de méthanol (30% vol/vol), ajouter 50 mL d'acide acétique Ultrapure (10% vol/vol). Compléter le volume à 500 mL dans un ballon jaugé.



## Méthodes

### ➤ Préparation des échantillons

Le tampon d'échantillon est réduit par ajout de 36 µL de DTT à l'aliquot de 300 µL. Au besoin, diluer les échantillons avec du RB 1x afin d'obtenir une concentration finale de l'échantillon de 1,5x (essentiellement lorsque l'on veut injecter la même quantité de protéines dans chaque puits). Les échantillons sont réduits avec le tampon d'échantillon réducteur + DTT pour obtenir une concentration finale 1x (rapport échantillon : sample buffer réducteur = 2 : 1). Le volume final est de 60 µL (40 µL + 20 µL). Chauffer les échantillons 5 minutes à 100°C. Charger 15/20 µL de chaque échantillon dans le puits correspondant.

### ➤ Conditions de migration

La migration du gel est effectuée pendant 10 minutes à 70 volts et 60 minutes (ou moins, en fonction de la vitesse d'élution) à 140 volts en utilisant le système d'électrophorèse Mini PROTEAN®.

### ➤ Coloration à l'argent

Le protocole suivant est basé sur les instructions du kit Silver Stain Plus de BIO-RAD (Cat # 161-0449). Pour éviter des dépôts d'argent sur les plaques de colorations et ainsi éviter des colorations incohérentes, tous les contenants utilisés pour la préparation des solutions doivent être rigoureusement nettoyés avec du Sparkleen et rincés avec de l'eau Milli-Q avant un nettoyage à l'acide nitrique 70% (10 minutes), et un second rinçage à l'eau Milli-Q, et ce avant chaque utilisation.

Une première étape de fixation avec la solution améliorant la fixation est effectuée avec le gel pendant un minimum de 20 minutes. Ensuite, le gel est rincé avec de l'eau Mili-Q (2 fois 10 min). Le gel est alors coloré avec la solution de développement pendant approximativement 20 minutes ou jusqu'à une intensité de coloration suffisante. Enfin, la réaction de coloration est arrêtée par addition d'une solution d'acide acétique 5% pendant 15 minutes au moins. Le gel peut être conservé pour une longue durée dans la solution de glycérol 5% et acide acétique 10%.

## ANNEXE 5 – WESTERN BLOT

Cette procédure donne des informations spécifiques pour effectuer un Western-Blot (WB) à la suite d'une électrophorèse SDS-PAGE de particules pseudo-virales et d'autres échantillons protéiques (§ 4.5.1). Le WB est la méthode utilisée pour l'identification de protéines après liaison à un anticorps spécifique.

### Produits

- Réactifs de Chimiluminescence BM (Roche)
- Chlorure de potassium (KCl) (EMD)
- Phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (EMD)
- Chlorure de sodium (NaCl) (EMD)
- Phosphate de sodium dibasique anhydre ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (EMD)
- Tween-20 (Bio-Rad)
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)
- Lait écrémé en poudre (Bio-Rad)
- Tris (Bio-Rad)
- Glycine (Bio-Rad)
- Méthanol (J.T. Baker)

### Préparation des réactifs pour Western Blot

- PBS 10× (1000 mL) contenant 2,0 g de KCl, 2,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80,0 g de NaCl et 21,6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- PBS-Tween (0,1%) (1000 mL)
- Lait écrémé en poudre 5% dans PBS-T (0,1%) (100 mL)

- Towbin (Tampon de transfert) (1000 mL) contenant 3,03g de Tris, 14,41g de Glycine et 200 mL de méthanol.

## Méthodes

Après l'électrophorèse, retirer le gel de la cuve et le rincer rapidement, trois fois au moins, avec le tampon de transfert, et ce en 5 minutes. Placer les différentes couches au-dessus de l'anode de la cuve de transfert (Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell) dans l'ordre suivant : 2 × papier de transfert; 1 × membrane NC; gel; 2 × papier de transfert. Faire migrer à 10 V pendant 60 minutes.

Une fois le transfert complété, bloquer les protéines avec la solution de lait écrémé 5% / PBS-T (0,1%) pendant une heure, à température ambiante et sous agitation. Laver ensuite la membrane de NC avec du PBS-T (0,1%) en agitant (1 × 15 min et 2 × 5 min). Ajouter l'anticorps primaire (choisi en fonction de la protéine analysée) à une dilution appropriée dans du PBS-T (0,1%). Incuber toute la nuit.

Le jour suivant, laver la membrane de NC avec PBS-T (0,1%) tout en agitant et ajouter l'anticorps secondaire conjugué (celui-ci dépend de l'origine de l'anticorps primaire) à une dilution appropriée dans du PBS-T (0,1%). Incuber au minimum 1 heure. Laver la membrane de NC avec du PBS-T (0,1%). Les protéines spécifiques sont identifiées grâce à un kit spécifique de réactifs, le kit Chimiluminescence BM. 60

## ANNEXE 6 – ANALYSE DE L'INFECTIVITÉ DES STOCKS DE BACULOVIRUS PRODUITS

Pour conduire les expériences liées à la production de VLP (sur une période de 18 mois), il a été nécessaire de produire de nouveaux stocks de rBV en cellules Sf9. Les titres viraux ont été déterminés par le test d'infectivité Titerless (§ 4.4.3). Un suivi de production a également été réalisé en mesurant l'évolution de la viabilité et du diamètre moyen des cellules. Ces deux paramètres sont habituellement considérés comme des indicateurs importants pour confirmer l'efficacité d'infection des cellules (augmentation du diamètre de ~16 à ~20  $\mu\text{m}$ ) et pour définir le temps de récolte (viabilité avoisinant 65 % afin de limiter le relargage excessif de contaminants intracellulaires).

Table annexe 4 : Titres infectieux des stocks de rBV obtenus par Titerless pour les différentes productions.

# de passage	1	2	3*	4
Intervalle entre les productions	0 mois	7 mois	13 mois	18 mois
Type de rBV	Titres infectieux (PVI/mL)			
<b>rBV-HA</b>	$1,02.10^8$	$3,00.10^8$	$7,33.10^8$	$1,35.10^5$
<b>rBV-NA</b>	$1,21.10^8$	$2,60.10^9$	$3,11.10^{10}$	$4,37.10^8$
<b>rBV-M<sub>1</sub></b>	-	$1,60.10^9$	$1,46.10^{10}$	$5,65.10^8$

\* : Production à haute densité cellulaire en mode fed-batch [118].

Les stocks de rBV ont été produits de façon classique ou encore à haute densité cellulaire en mode fed-batch afin d'augmenter les titres obtenus (ce qui explique les différences de titres pour un même baculovirus entre les différents passages). Dans la Table annexe 4, il est important de noter la différence de titres entre les trois stocks pour un même passage ; ces stocks sont pourtant produits simultanément et avec les mêmes conditions de culture (inoculum de culture, densité cellulaire à infection, MOI, temps de récolte, etc.). Ainsi, on remarque la chute en titre infectieux pour le rBV-HA par rapport aux deux autres. Jusqu'au passage 2, les titres des 3 rBV sont similaires, mais à partir du 3<sup>ème</sup> passage, le titre du rBV-HA devient inférieur de 2 log et descend à plus de 3 log de différence lors du passage 4.

En termes de particules totales, la même observation a été notée (résultats non-montrés). Le rBV-HA donne au fil des passages des titres plus faibles que les deux autres. Considérant qu'un stock de baculovirus est habituellement jugé satisfaisant lorsque le rapport entre les particules totales et infectieuses se situe autour de 1 log, il a été remarqué que ce rapport augmente graduellement pour le rBV-HA pour atteindre près de 2 log (passage # 4) contre 1 log pour les rBV-NA et M<sub>1</sub>.

Cette observation semble mettre en évidence un problème dans la production du rBV-HA. Bien que les suivis effectués suggèrent que les virus ont pénétré et se sont répliqués dans les cellules (le diamètre des trois cultures étant à chaque passage identiques et proches de 20 µm), la viabilité cellulaire était quant à elle différente entre les productions (Table annexe 5).

Table annexe 5 : Viabilités cellulaires mesurées lors des productions rBV.

# de passage	1	2	3*	4
Heures post-infection (hpi)	72	48	90	71
Type de rBV	Viabilité cellulaire (%)			
<b>rBV-HA</b>	22	64	91	86
<b>rBV-NA</b>	34	64	79	52
<b>rBV-M<sub>1</sub></b>	18	53	69	47

\* : Production à haute densité cellulaire en mode fed-batch [118].

Alors que les viabilités sont semblables dans les 2 premiers passages pour les trois productions, il apparaît que les cellules demeurent intactes dans la culture du rBV-HA avec une viabilité élevée après plus de 72 hpi dans les passages suivants. Il semblerait donc que les baculovirus soient incapables de sortir des cellules hôtes ou encore de conserver leur infectivité (construction instable).

Cette incapacité à produire un stock de rBV-HA à un titre infectieux suffisamment élevé a donc constitué une limitation supplémentaire pour les essais de production de VLP. Cela remet également en doute la capacité du rBV-HA utilisé dans ces travaux à fournir aux cellules productrices le gène d'intérêt en grande quantité.

## ANNEXE 7 – ETABLISSEMENT D'UNE COURBE STANDARD EN RP-HPLC EXPRIMANT LA CONCENTRATION DE HA EN $\mu\text{G/ML}$

La majeure partie des doses vaccinales sont exprimées en  $\mu\text{g}$  de HA/mL suite à sa quantification par SRID. Ce test étant long à mettre en place, une approche simplifiée a été envisagée afin d'obtenir le rapport entre la quantité de HA en  $\mu\text{g/mL}$  provenant de la souche A/PR/8/34 et l'aire sous le pic mesurée en RP-HPLC. Ceci a permis de comparer ce rapport avec celui obtenu pour un standard externe quantifié par SRID (HA recombinante pure de la souche A/PR/8/34).

Pour ce faire, le pic de HA1, provenant du standard concentré de la souche A/PR/8/34, a été collecté à plusieurs reprises. Après évaporation de l'acétonitrile et concentration de la sous-unité, l'échantillon a été quantifié en protéines totales (mesure UV à 280 nm) via l'utilisation du Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific). Le coefficient d'extinction molaire de la sous-unité HA1 a été obtenu par analyse de sa séquence en acides aminés par le programme ExPASy ProtParam [120]. La valeur du coefficient,  $53860 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , a été obtenue pour la forme réduite du peptide. Dans ce cas, la concentration mesurée représente uniquement celle de la sous-unité HA1, étant donné que le pic collecté est pur. Cette concentration est de  $17,52 \pm 2,96 \mu\text{g/mL}$  (moyenne et écart-type obtenus sur 4 mesures; ETR de 16,89 %). L'ETR est élevé ici car la concentration de l'échantillon est très faible ce qui augmente l'erreur sur la mesure.

Par réinjection de  $5 \mu\text{L}$  du pic de HA1 non-dilué (à deux reprises), il a été possible de connaître le rapport entre la quantité injectée (en  $\mu\text{g}$ ) et la réponse obtenue (aire du pic) par le système (Table annexe 6).

Table annexe 6 : Aires sous le pic obtenues pour la sous-unité HA1 collectée-concentrée et le standard externe.

Échantillon	Moyenne aire du pic	ETR (%)	Rapport aire du pic/concentration
Pic de HA1 ( $17,52 \mu\text{g/mL}$ )	$32,46 \pm 0,31$	0,96	1,85
HA recombinante ( $20,2 \mu\text{g /mL}$ )	$35,48 \pm 0,53$	1,49	1,76

A titre de comparaison, 5  $\mu\text{L}$  d'hémagglutinine recombinante pure (rHA) de la souche A/PR/8/34, produite en cellules d'insectes Sf9 et de concentration connue par SRID (20,2  $\mu\text{g/mL}$ ), ont été injectés à trois reprises (standard fourni par Protein Sciences).

Suite aux injections de ces deux échantillons, il a été possible de comparer les rapports entre les aires sous le pic mesurées et leurs concentrations initiales. Ainsi, ces rapports sont assez semblables comme présenté à la Table annexe 6. Si on considère les erreurs dues à la mesure de faible concentration pour le pic de HA1 collecté, on peut conclure que le facteur de réponse obtenu pour la protéine recombinante commerciale est similaire à celui obtenu pour la sous-unité provenant du virus sauvage. Le fait que cette protéine ne provienne pas directement du virus et soit produite en Sf9 ne semble pas affecter la réponse. Dès lors, il a été possible de considérer comme valable l'établissement d'une courbe standard pour la souche A/PR/8/34 au départ de cette rHA, dont la concentration est exprimée en  $\mu\text{g/mL}$  (Figure annexe 2).

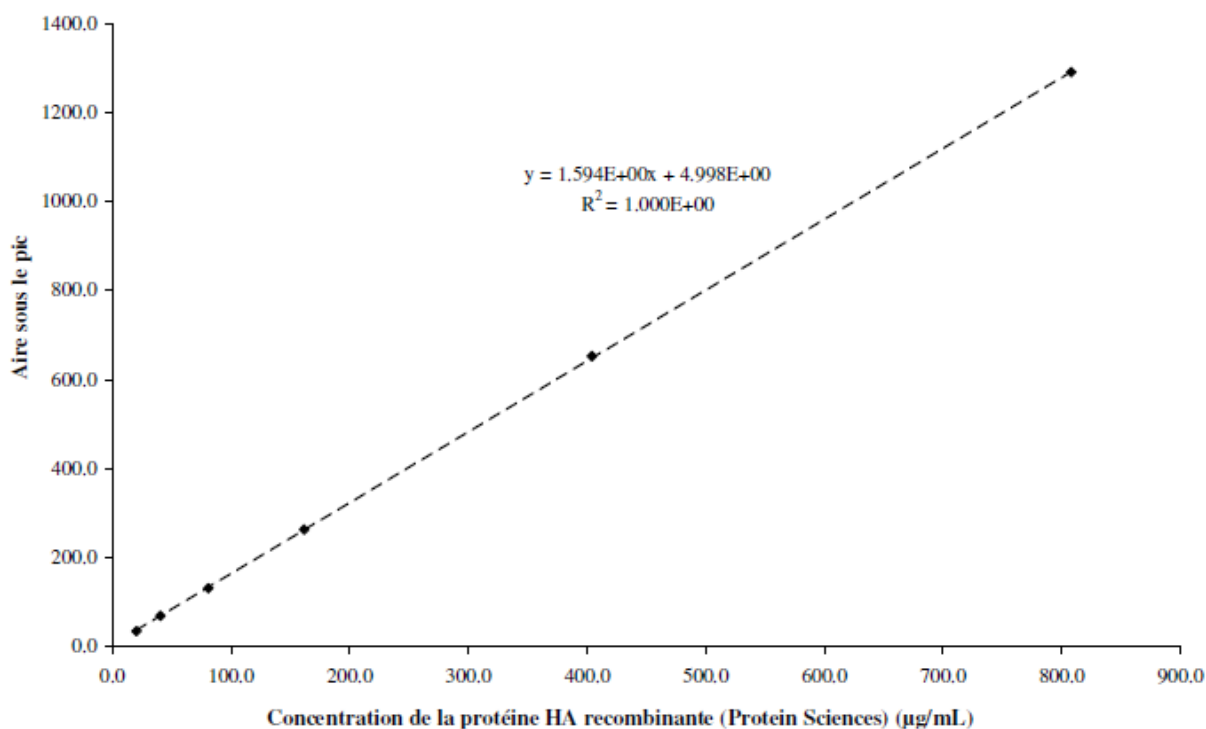


Figure annexe 2 : Courbe standard établie pour la protéine HA recombinante (Protein Sciences) pour la quantification de HA de 20,2 à 808,0  $\mu\text{g HA/mL}$ .

Suite à l'obtention de cette droite de calibration, le rapport entre les unités de HA/mL et  $\mu\text{g/mL}$  a pu être calculé. Ce rapport se base sur les pentes des deux équations obtenues pour les courbes standards et qui expriment l'aire sous le pic en fonction des concentrations de HA en unités de HA/mL et en  $\mu\text{g}$  de HA/mL (Table annexe 7). Bien que sujet à des erreurs, ce rapport permet du moins d'obtenir une estimation rapide des quantités virales produites en culture cellulaires en  $\mu\text{g/mL}$  de HA.

Table annexe 7 : Estimation du facteur entre  $\mu\text{g}$  de HA/mL et unités de HA/mL.

Pente 1 : AP/( $\mu\text{g}$ HA/mL)	1,59
Pente 2 : AP/(unités HA/mL)	$2,78.10^{-3}$
Rapport (Unités HA / $\mu\text{g}$ HA)	573

Ainsi, en faisant abstraction des erreurs expérimentales, un  $\mu\text{g}$  de HA de la souche A/PR/8/34 correspond à 573 unités de HA. Il est important de mentionner que ce rapport a uniquement été validé pour la souche Puerto Rico. Selon la souche analysée, il est probable que ce dernier change. Au départ de ce même rapport, il est possible d'estimer la limite de détection de la méthode pour la souche standard Puerto Rico à environ  $6,5 \mu\text{g/mL}$  ( $3,71.10^3$  unités HA/mL / 573), soit une valeur 3 fois plus faible que celle habituellement retrouvée dans une dose vaccinale ( $15 \mu\text{g/mL}$ ).

Bien que l'obtention d'un standard hautement caractérisé et quantifié par SRID soit requise, cette analyse comparative permet à tout le moins d'effectuer rapidement une comparaison des productions virales en culture de cellules avec les doses vaccinales.